PENTOSEPHOSPHATSHUNT LANGERHANSSCHER INSELN UND INSULINSEKRETION

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Monika Händel
aus Stuttgart

1978

78 401

PENTOSEPHOSPHATSHUNT LANGERHANSSCHER INSELN UND INSULINSEKRETION

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Monika Händel
aus Stuttgart

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 1978

Dekan: Professor Dr. H. Auterhoff

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Professor Dr. J.-E. Schultz

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im November 1975 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im April 1978 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die zahlreichen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon, insbesondere Herrn Dr. E. Verspohl, für stete Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

ABKÜRZUNGEN

6-AN	6-Aminonicotinamidsäure
p-CMB	p-Chlormercuribenzoat
cpm	counts per minute = Zählrate pro Minute
dpm	disintegrations per minute = Zerfälle pro Minute
E	Einheiten
ESR	external standard ratio = externer Standard
% η	"efficiency" = Zählausbeute in %
Fr-6-P	Fructose-6-phosphat
Fr-1,6-P_2	Fructose-1,6-biphosphat
GPAIS	guinea pig anti-insulin serum
G-6-P	Glucose-6-phosphat
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
IRI	immunoreaktives Insulin
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
LSC	liquid scintillation counter
mmol	Millimol
mM	millimolar
min	Minute
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat(reduziert)
n.s.	nicht signifikant
6-PG	6-Phosphogluconat
pmol	Picomol
PPS	Pentosephosphatshunt

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL und METHODIK	8
2.1	Versuchstiere	8
2.2	Chemikalien	8
2.3	Nährlösungen	9
2.3.1	Krebs-Ringer-Bicarbonat (KRB)-Lösung	9
2.3.2	Hanks-Lösung	10
2.4	Szintillationslösungen	11
2.4.1	auf Dioxan Basis (Bray-Lösung)	11
2.4.2	auf Toluol Basis	11
2.5	Geräte	11
2.6	Herstellung des Insulin-Antikörpers	12
2.6.1	Behandlung der Tiere	12
2.6.2	Serumgewinnung	12
2.6.3	Bestimmung der Bindungskapazität des Insulin-Antikörpers	13
2.7	Isolierte Langerhanssche Inseln	16
2.7.1	Operation und Isolierung	16
2.7.2	Herstellung der KRB-Lösung für die Inkubation der Inseln	18
2.7.3	Vorinkubation	18
2.8	Bestimmung der Aktivität des PPS	19

2.8.1	THO - Bildung aus $[5\text{-}^{3}H]$ Glucose	19
2.8.2	$^{14}CO_2$- Bildung aus $[1\text{-}^{14}C]$- und aus $[6\text{-}^{14}C]$ Glucose	21
2.8.3	Quenchkurven	24
2.8.4	Berechnung des Pentosephosphatshunts	29
2.8.4.1	Berechnung der Glucoseutilisation	29
2.8.4.2	Berechnung der Glucoseoxidation	30
2.8.5	Herstellung der Inkubationslösungen	34
2.8.6	Versuchsbedingungen und Versuchsablauf	35
2.8.6.1	Versuchsbedingungen	35
2.8.6.2	Versuchsablauf	37
2.9	Messung der Insulinsekretion	40
2.9.1	Versuchsbedingungen	40
2.9.1.1	Untersuchungen mit Insulin-Antiserum	41
2.9.1.2	Untersuchungen mit Exogenem Insulin	42
2.9.2	Bestimmungsmethode für Insulin	44
2.9.2.1	Messung der Insulinkonzentration im Inkubationsmedium in Gegenwart von Insulin-Antikörpern	46
2.9.2.2	Untersuchungen mit Exogenem Insulin	48
2.10	Versuchsauswertung	49
3	VERSUCHSERGEBNISSE	50
3.1	PPS Aktivität und Medium Insulin	50
3.1.1	Dosis-Wirkungsbeziehungen in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen	51

3.1.2	Abhängigkeit der PPS Aktivität und der Insulinsekretion von unterschiedlichen Konzentrationen an GPAIS	61
3.2	Einfluß von exogenem Insulin auf die durch p-Chlormercuribenzoat,Aminophyllin, Tolbutamid,Arginin,Leucin und Glucose induzierte Insulinsekretion	64
3.2.1	p-Chlormercuribenzoat	64
3.2.2	Aminophyllin	67
3.2.3	Tolbutamid	69
3.2.4	Arginin•HCl	72
3.2.5	Leucin	72
3.2.6	Glucose (11,1 mM)	75
4	DISKUSSION	77
4.1	Abhängigkeit der Aktivität des PPS von der Glucose- und der Insulinkonzentration im Medium	77
4.2	Einfluß von exogenem Insulin auf die durch p-Chlormercuribenzoat,Theophyllin, Tolbutamid,Arginin und Leucin induzierte Insulinsekretion	84
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
	Literaturverzeichnis	97
	Tabellen	113

1. E I N L E I T U N G

Der physiologisch bedeutendste Stimulator der Insulinsekretion ist die Glucose. Der Mechanismus über den Glucose das Signal zur Freisetzung von präformiertem Insulin aus der ß-Zelle gibt, ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Folgende zwei Arbeitshypothesen werden diskutiert:

1.

Das Glucosemolekül trifft an der ß-Zellmembran auf einen Rezeptor und setzt somit die Insulinsekretion in Gang. Für diese Annahme sprechen viele Ergebnisse, u.a. die Untersuchungen von Matschinsky et al. (1), nach denen auf Glucosegabe einerseits eine sofortige Insulinantwort erfolgt, andererseits aber erst später in der ß-Zelle ein Anstieg der Metaboliten wie G-6-P, 6-PG, Fr-1,6-P_2 und 3-P-Glycerat zu sehen ist.

Von Galactose und anderen Monosacchariden wie Xylit, Sorbit und Zuckerderivaten wie 3-Methylglucose, die z.T. nicht oder nur langsam metabolisiert werden, wird ebenfalls gezeigt, daß sie die Insulinsekretion zu stimulieren vermögen. Weitere allgemein anerkannte Tatsachen - die für die Rezeptortheorie sprechen - sind, daß Glucose die Insulinsekretion aus der ß-Zelle in Abhängigkeit von seiner Konzentration (2,3) steigert und daß Mannoheptulose - ein Hemmstoff der Hexokinase - die Glucose induzierte Insulinsekretion sofort, die Glucosemetabolisierung erst nach 15 Minuten stoppt (4,5).

2.

Die zweite Hypothese lautet:
Zwischenprodukte, die beim Abbau der Glucose über den Embden-Meyerhof-Abbau entstehen, sind die Regulatoren der Insulinfreisetzung.
Diese Aussage gründet sich u.a. auf Ergebnisse, die einen linearen Anstieg von Glucosemetaboliten aus der Glykolyse mit zunehmender Glucosekonzentration im Medium zeigen (2,6,7). Andererseits kann durch Blockade der Glykolyse mit 2-Deoxy-D-Glucose oder Jodacetat die Insulinsekretion gehemmt werden (8).

Als weitere Möglichkeit, die Glucose induzierte Insulinsekretion zu regulieren, wird seit einigen Jahren die Rolle des Pentosephosphatshunts (PPS) diskutiert. In mehreren endokrinen Geweben, z.B. Hypophyse, Schilddrüse und Nebennierenrinde wird diesem Abbauweg ebenfalls eine große Bedeutung bei der aktiven Sekretion beigemessen (9,10,11,12).

Die Funktion des PPS in den Langerhansschen Inseln und bei deren Insulinsekretion ist dagegen noch sehr umstritten.
So sehen Ashcroft et al. (13) an den Pankreasinseln der Maus, Snyder et al. (14) an isolierten Inseln der Ratte und Hostetler et al. (15) an Fischinseln mit steigender Glucosekonzentration zwar einen Anstieg der Insulinsekretion, jedoch keine Änderung bzw. eine Senkung der absoluten Abbaurate von Glucose über den Pentosephosphatshunt.
Hostetler et al. schränken jedoch ihre Befunde ein, indem

sie auf das Vorhandensein von α- und δ - Zellen neben den ß-Zellen in den Langerhansschen Inseln verweisen und auf die Zeitspanne, die zwischen dem Ablauf der wichtigsten Abbauschritte in den ersten Minuten der Inkubation und der gesamten Inkubationsdauer von 1 bis 2 Stunden liegt. Hedeskov und Capito (16) untersuchten isolierte Pankreasinseln von Mäusen, die zuvor 48 Stunden gehungert hatten. Auch sie finden keinen Unterschied in der absoluten Rate der Glucosemetabolisierung über den PPS bei gehungerten und gefütterten Tieren, so daß keine Korrelation zwischen der verminderten Insulinsekretion während des Hungers und dem Glucoseabbau über den PPS hergestellt werden kann. Auf Grund der oben angeführten Ergebnisse wird von den Autoren argumentiert, daß ein Stoffwechselweg, dessen Aktivität nicht mit der Glucosekonzentration zunimmt, für die Insulinsekretion unbedeutend sei, da diese von der Glucosekonzentration abhängig ist.

Schon bald jedoch sind Untersuchungen bekannt geworden, die mit den oben aufgezeigten Befunden nicht in Einklang zu bringen sind. So finden Keen et al. (17) und Jarret und Keen (18) einen Anstieg der Glucoseoxidation im PPS zusammen mit einem Anstieg der Insulinsekretion, wenn die zugesetzte Glucosemenge von 20 auf 200 mg/100 ml bzw. von 40 auf 400 mg / 100 ml erhöht wurde, obwohl ihre Inkubationsbedingungen denen anderer Autoren entsprechen. Sie beziehen sich in ihrer Aussage auf den Anstieg der absoluten Rate der Glucoseoxidation aus $\left[1\text{-}^{14}C\right]$ Glucose, der höher ist als der aus $\left[6\text{-}^{14}C\right]$-Glucose.

Auch die Anreicherung von 6-Phosphogluconat und NADPH (19,20,21) bei Inkubation mit steigenden Glucosekonzentrationen weist auf die Beziehung zwischen Insulinsekretion und Pentosephosphatshunt.

Bei Inseln foetaler Ratten beobachteten Heinze und Steinke (22) zwar einen Abbau der Glucose über die Glykolyse, nicht aber über den PPS. Die Inseln waren zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nicht in der Lage, auf einen Glucosereiz mit einer Insulinsekretion zu antworten. Erst zwei Tage nach der Geburt setzte der Glucoseabbau über den PPS ein und damit gleichzeitig die Glucose induzierte Insulinsekretion.

Der Frage, ob Glucoseabbau über den PPS und Insulinsekretion in einem Zusammenhang stehen, wurde in weiteren Untersuchungen von Ammon und Steinke (23,24) nachgegangen. Sie fanden dabei, daß eine Hemmung des PPS in den Langerhansschen Inseln hervorgerufen durch 6-Aminonicotinamid (6-AN) - einem Antimetaboliten der Pyridinnukleotidsynthese (vorwiegend des NADP) - mit einer Hemmung der durch Glucose induzierbaren Insulinsekretion einhergeht.

Eine Hemmung der Insulinsekretion hervorgerufen durch Glucose kann ebenfalls durch den Zusatz von exogenem Insulin erzielt werden. Dies zeigen Untersuchungen von Iversen und Miles (25), Rapoport et al. (26), Frerichs et al. (27), Assal et al. (28), Loreti et al. (29) u.a.m., die finden, daß in Gegenwart von exogenem Insulin die Insulinsekretion zurückgedrängt oder ganz gehemmt wird.

Ausgehend von diesen Ergebnissen setzten Ammon und Verspohl (30)

und Assal et al. (28) exogenes Insulin für ihre Untersuchungen am Pentosephosphatshunt der isolierten Pankreasinsel ein. Sie stellten dabei eine Abnahme des NADPH/NADP - Quotienten und/bzw. eine Abnahme der Glucoseoxidation über den PPS fest und das bereits bei Konzentrationen von 200 - 400 µE IRI/ml.

Diese Ergebnisse veranlassen zu einem Vergleich der in vitro Untersuchungen vieler Autoren und der in vivo Bedingungen der Insulinsekretion. Im Gegensatz zu den in vivo Bedingungen lassen die in vitro ausgeführten Versuche eine hohe Akkumulation von Insulin im Medium zu, vor allem wenn viele isolierte Pankreasinseln in wenig Medium und besonders in Gegenwart von hohen Glucosekonzentrationen über eine längere Zeitspanne (2 bis 3 Stunden) inkubiert werden. Diese Sättigung des Mediums mit Insulin wird in vivo wohl nur in der nächsten Umgebung der Langerhansschen Insel (31) und nur bei maximaler Stimulierung der Insulinfreisetzung auftreten.

Diese Überlegungen und die oben genannten Untersuchungsergebnisse mit exogenem Insulin führen zu der Frage, ob nicht, wenn die Akkumulation von sezerniertem Insulin im Inkubationsmedium vermindert oder ganz ausgeschlossen wird, doch eine Abhängigkeit der PPS Aktivität von der Glucosekonzentration zu beobachten ist.
Um eine Anreicherung von Insulin im Inkubationsmedium zurückzudrängen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Inkubationsbedingungen geändert. Zum anderen wurde das durch die Inseln

freigesetzte Insulin durch den Zusatz von Insulin-Antikörpern zum Inkubationsmedium abgefangen und somit eine Akkumulation von Insulin vollständig unterbunden. Der Anteil des freien, reaktiven Insulins wird dauernd klein gehalten und es bietet sich so die Möglichkeit, die Aktivität des PPS in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration ohne den Einfluß hoher Insulinkonzentrationen zu messen.

Wie bereits ausgeführt, hemmt exogenes Insulin sowohl die durch Glucose induzierte Insulinsekretion als auch die Aktivität des Pentosephosphatshunts (30) und auf Grund dieser Befunde wird vermutet, daß die Empfindlichkeit der ß-Zelle gegenüber dem Glucosesignal von der Aktivität des PPS abhängt.

Neben der Glucose führen eine Reihe anderer Stoffe wie p-Chlormercuribenzoat, Theophyllin, Tolbutamid oder die Aminosäuren Leucin und Arginin zur gesteigerten Sekretion von Insulin. Die genannten Stoffe entstammen sehr verschiedenen Substanzklassen und es wird angenommen, daß sie das Signal zur Sekretion von Insulin auf andere Art und Weise liefern als die Glucose.

Andererseits ist bekannt, daß in Anwesenheit von Glucose ihre sekretorische Wirkung am besten ist.

Diese Beobachtung gibt Anlaß zu der Annahme, daß die genannten Stoffe den Metabolismus der Glucose, evtl. auch deren Abbau über den PPS benötigen, um die Insulinsekretion anzuregen.

Es wurde daher im zweiten Teil dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob durch solche Konzentrationen an exogenem Insulin, die die Glucose induzierte Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln und die Aktivität des PPS hemmen, auch die sekretorische Wirkung der anderen Stimulatoren eingeschränkt oder sogar vollständig gehemmt werden kann.

2. MATERIAL und METHODIK

2.1 Versuchstiere

Zur Gewinnung isolierter Langerhansscher Inseln werden Wistar-Ratten gehalten. Verwendet werden Tiere beiderlei Geschlechts mit einem durchschnittlichen Gewicht von 220 - 280 g.

Insulin-Antikörper werden aus dem Serum von Meerschweinchen gewonnen. Die Tiere werden zu diesem Zweck einmal wöchentlich mit Schweineinsulin gespritzt. Ihr Gewicht beträgt ca. 200 g und erhöht sich während des Behandlungszeitraumes von 3-4 Monaten auf ca. 800 - 900 g.

Ratten und Meerschweinchen werden in temperatur- und lichtkontrollierten Räumen bei 24 ^{o}C gehalten und haben freien Zugang zu Standardfutter (Altromin Futterwerk, Lage/Lippe) und Wasser.

2.2 Chemikalien

p-Chlormercuribenzoat (Na-Salz)	Merck-Schuchardt, München
Collagenase (196 E/mg)	Worthington Biochem. Corp.,Freehold, U.S.A.
Dextran (MG 60 000 - 90 000)	Serva, Heidelberg, BRD

Freundsches Adjuvans	Difco Lab., Detroit, U.S.A.
D-Glucose	Serva, Heidelberg
[1-^{14}C] Glucose (SA 54,5 mCi/mmol), [6-^{14}C] Glucose (SA 56,6 mCi/mmol), [5-^{3}H] Glucose (SA 19,0 Ci/mmol)	Radiochemical Centre, Amersham, U.K.
Hyamine Hydroxide®, Hyaminhydroxid	New England Nuclear Corp., Boston, U.S.A.
INSIK-1® (Insulin Radioimmunoassay Kit)	Isotopen Dienst West, Sprendlingen
[^{125}J] Insulin	Isotopen Dienst West, Sprendlingen
Liquemin 25 000; 25 000 USP-E. Natriumheparinat	Hoffmann-La Roche AG Grenzach-Wyhlen
Ratteninsulin	Novo Lab., Copenhagen
Rinder-Serumalbumin	Behringwerke, Marburg
Schweineinsulin	Hoechst AG, Frankfurt
Tolbutamid (Na-Salz), Rastinon®	Hoechst AG, Frankfurt

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien stammen von der Firma Merck, Darmstadt und waren "p.a".

2.3 Nährlösungen

2.3.1 Krebs-Ringer-Bicarbonat (KRB)-Lösung

Es wird die KRB-Lösung nach der Originalbeschreibung von Umbreit et al. (32) verwendet. Der besseren Haltbarkeit wegen wird die Lösung aus drei voneinander getrennten Lösungen folgender Zusammensetzung hergestellt:

Lösung "A"	(Stammlösung ohne $NaHCO_3$ und $CaCl_2$)	
	NaCl	69,20 g
	KCl	3,61 g
	KH_2PO_4	1,62 g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	2,93 g
	Aqua dest.	ad 1 Liter
Lösung "B"	($NaHCO_3$ - Lösung)	
	$NaHCO_3$	21,10 g
	Aqua dest.	ad 1 Liter
Lösung "C"	($CaCl_2$ - Lösung)	
	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	3,73 g
	Aqua dest.	ad 1 Liter

Die Lösungen werden getrennt voneinander bei + 4 °C aufbewahrt und vor Gebrauch (wie später angegeben) gemischt.

2.3.2 Hanks Lösung

Stammlösung	NaCl	80,00 g
	KCl	4,00 g
	$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	0,76 g
	KH_2PO_4	0,60 g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	2,00 g
	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	1,85 g
	Aqua dest.	ad 1 Liter

Vor Gebrauch wird diese Stammlösung 1 + 9 mit destilliertem Wasser verdünnt und der pH Wert mit $NaHCO_3$-Lösung auf 7,35 eingestellt.

2.4 Szintillationslösungen

2.4.1 auf Dioxan Basis (Bray-Lösung)

Dioxan	440,0 ml
Äthylenglykol	10,0 ml
Methanol	50,0 ml
PPO	1,9 g
Naphthalin	30,0 g

Die Lösung dient zur Aufnahme von wässrigen Lösungen.

2.4.2 auf Toluol Basis

PPO	4,00 g
POPOP	0,05 g
Toluol	ad 1000,0 ml

Die Lösung dient zur Aufnahme von Hyaminhydroxid.

2.5 Geräte

Automatischer Gamma Zähler Modell 4233	Nuclear-Chicago Corp. Illinois, U.S.A.
Gefriertrocknungsanlage Beta	Christ GmbH, Osterode,BRD
Isocap 300/ Liquid Scintillation System	Nuclear-Chicago Corp. Illinois, U.S.A.
Laborzentrifuge UJ II KS	Heraeus-Christ GmbH, BRD
Schüttel-Wasserbad 3047	Köttermann KG, Hänigsen, BRD
Stereomikroskop Modell SM 6	Nikon, Nippon Kogaku K.K.
Tischcomputer Olivetti P 602	Olivetti GmbH

2.6 Herstellung des Insulin-Antikörpers

2.6.1 Behandlung der Tiere

Wie auch schon bei anderen Autoren, z.B. Pfeiffer et al. (33) beschrieben, werden, um Serum mit Insulin-Antikörpern zu gewinnen, Meerschweinchen mit Schweineinsulin gespritzt. Die Haltung der Tiere ist bereits im Abschnitt 2.1 beschrieben worden. Ihnen wird wöchtentlich 1 ml einer Emulsion aus 2 E gereinigtem Schweineinsulin-Monokomponente und Freundschem Adjuvans im Verhältnis 1:1 injiziert. Die Injektion erfolgt subcutan.

Freundsches Adjuvans ist eine Mischung aus einem Detergens (Arlacel A®) und Paraffin und enthält abgetötete Tuberkelbakterien. Die Notwendigkeit seines Zusatzes zu der Substanz, gegen die immunisiert wird, ist unumstritten, seine Wirkungsweise wird jedoch unterschiedlich erklärt. Diskutiert werden eine Depotwirkung für das Antigen oder eine Verzögerung seines Abbaues sowie eine Erleichterung der Phagocytose von Antigenen durch Makrophagen.

Die Behandlungsdauer der Tiere beträgt ungefähr 4 Monate, d.h. die Tiere müssen mindestens 12 Injektionen erhalten.

2.6.2 Serumgewinnung

Nach ca. 12-15 Injektionen bekommen die Tiere vor der Serumgewinnung 2 ml einer Lösung von 1 400 E Heparin injiziert und werden nach 20 Minuten mit Äther anaesthesiert. Dann

können durch Herzpunktion ca. 15 ml Blut abgenommen werden. In Plastikgläschen, die einige Tropfen der Heparinlösung enthalten, läßt man über Nacht die Blutkörperchen absetzen und zentrifugiert dann 30 Minuten lang mit 3 000 U/min. Das überstehende Serum wird vorsichtig abgenommen, sein Volumen bestimmt und auf Petrischalen getropft. Das Serum wird 2 Stunden im Gefrierschrank bei -20 °C vorgefroren und dann gefriergetrocknet.
Das gefriergetrocknete Serum wird bei +4 °C gelagert und ist so mehrere Monate haltbar.

Auf gleiche Weise gewinnt man das Serum eines unbehandelten Meerschweinchens, das als sogenanntes "Normalserum" Kontrollproben zugesetzt wird. Diese dienen zum Vergleich mit den Proben, die einen Antikörper-Zusatz enthalten.

2.6.3 Bestimmung der Bindungskapazität des Insulin-Antikörpers

a) Material:

Puffer (lt. INSIK-1®)	$NaH_2PO_4 \times H_2O$	5,52 g
	Deionisiertes Wasser	ad 1 Liter
	NaOH (ca. 2 N) um pH 7,4 einzustellen	
Holzkohle-Suspension	Norit A (Holzkohle aktiv)	5,0 g
	Puffer	ad 100 ml
Dextran-Lösung	Dextran 80	0,5 g
	Puffer	ad 100 ml

Aktivkohle-Suspension und Dextranlösung werden getrennt bei + 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch gleiche Volumenteile gemischt.

b) Arbeitsgang

Um die Bindungskapazität des Meerschweinchen Anti-Insulin-Serums (GPAIS = guinea pig anti-insulin serum) in KRB-Lösung zu bestimmen, werden 4 µE (~1,48 x 10^{-4} µCi/ng) [^{125}J] Insulin mit steigenden Mengen an GPAIS zwischen 0 und 10 µl inkubiert.
Nach 120 Minuten wird durch Zugabe einer Dextran-Holzkohle-Suspension nach der Methode von Herbert et al. (34) das freie Antigen von dem Insulin-Antikörperkomplex abgetrennt, die Aktivkohle-Dextransuspension nimmt das freie Insulin auf. Man läßt die Suspension 5 Minuten absitzen, zentrifugiert 5 Minuten bei 3 000 U/min und zieht 1 ml des Überstandes ab, der das an den Antikörper gebundene Insulin enthält und bringt ihn in ein Szintillationsgläschen, dem 10 ml Bray-Szintillationslösung zugesetzt werden. Die Radioaktivität der Proben wird in einem "liquid scintillation counter" (LSC) gezählt.

c) Auswertung

Die Zählraten der einzelnen Proben werden zur Zählrate der Radioaktivität von [^{125}J] Insulin = 100 % = 4 µE ins Verhältnis gesetzt. Die solchermaßen errechneten Werte werden als "an den Antikörper gebundenes Insulin" in % bzw. µE auf

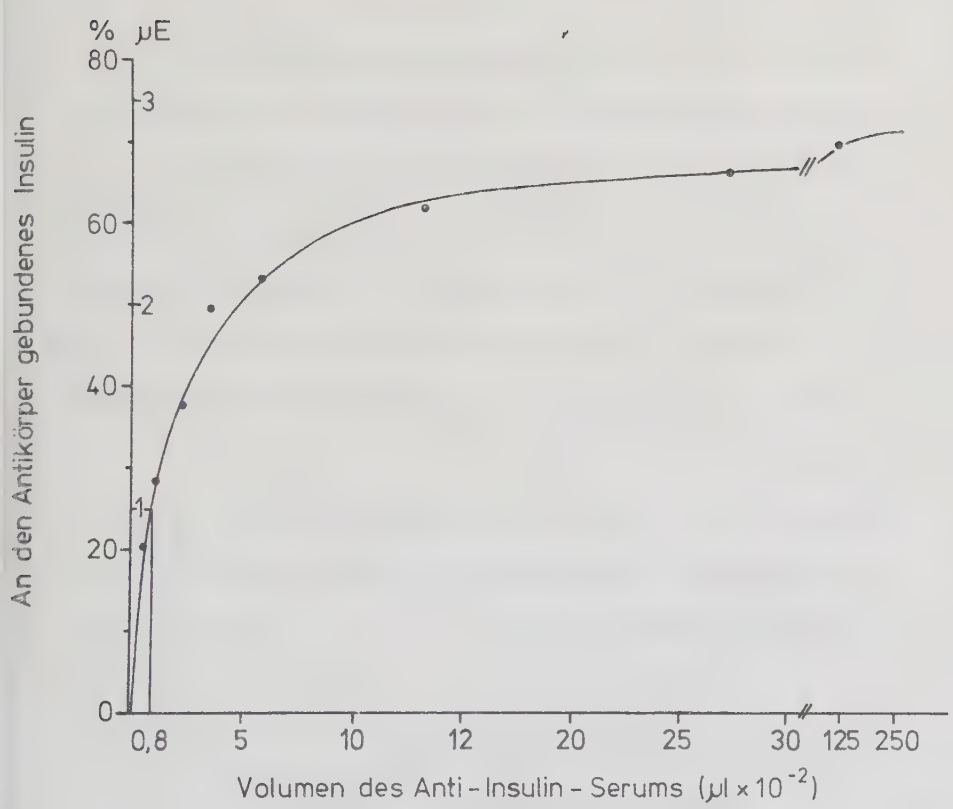


Abb. 1: Bindungskapazität des Insulin-Antikörpers
Bindung von $\left[^{125}J\right]$- Insulin an den Insulin-Antikörper in Abhängigkeit vom Volumen des zugesetzten Anti-Insulin Serums.

der Ordinate eines Koordinatensystems, die Volumina des zugesetzten Antiserums in µl auf der Abszisse abgetragen.

In Abbildung 1 ist die Bindungskapazität des bei den weiteren Versuchen eingesetzten Antiserums aufgezeigt. Man erhält einen dosisabhängigen Anstieg des an den Antikörper gebundenen Insulins bis zur Sättigung des Inkubationsmediums mit Antikörper. Aus der linearen Beziehung kann abgelesen werden, daß 0,008 µl GPAIS 1 µE Insulin binden bzw. daß 3,2 und 6,4 µl GPAIS benötigt werden, um 400 bzw. 800 µE Insulin zu binden. GPAIS wird bei den weiteren Untersuchungen in diesen Konzentrationen eingesetzt.

Die Bindungskapazität nimmt im Verlauf der Lagerung langsam ab. Deswegen muß sie monatlich überprüft und der Titer neu eingestellt werden.

2.7 Isolierte Langerhanssche Inseln

2.7.1 Operation und Isolierung

Die Ratten werden mit Äther betäubt. Durch einen Längsschnitt vom Becken bis zum Brustbein und je zwei Querschnitten unterhalb der Rippenbögen und rechts und links zum Becken hin wird das Abdomen eröffnet. Kurz nach der Endigung des Magens in das Duodenum führt der Ductus pancreaticus von der Leber kommend in den oberen Teil des Dünndarms. Diese Stelle wird aufgesucht, das Duodenum zum Magen hin abgeklemmt sowie der Ductus mit einem Faden zur Leber hin abgebunden. Man führt

nun vom Duodenum aus eine Injektionsnadel (Nr. 20) in den Ductus ein und injiziert ca. 10 ml eisgekühlte Hanks-Lösung.

Das auf diese Weise aufgeblähte Pankreas ist gut lokalisierbar, wird vom Duodenum, dem Magen und der Milz abgetrennt und in eine eisgekühlte Petrischale gebracht.

Hier wird das Pankreasgewebe zuerst vom Blut gereinigt, von dem anhängenden Fettgewebe befreit und mit einer kleinen Schere gleichmäßig und so fein zerschnitten, daß es durch den Konus einer Spritze aufgezogen werden kann. Das Volumen wird mit Hanks-Lösung auf 5 ml aufgefüllt und dann das gesamte zerschnittene Pankreas in ein Schnappdeckelgläschen gefüllt, in dem sich 25-30 mg Collagenase befinden.

Das Gläschen wird in einem thermostatierten Wasserbad von 38 ^{o}C stark geschüttelt, bis sein Inhalt vollkommen homogen geworden ist. Dieser Verdauungsprozeß durch die Collagenase dauert je nach deren Enzymaktivität 10-15 Minuten. Das exokrine Gewebe wird in dieser Zeit zerkleinert, d.h. verdaut, die eingeschlossenen Inseln werden freigelegt.

Der Verdauungsvorgang wird gestoppt, indem das Homogenat in ein kleines Becherglas gekippt wird und dreimal zur besseren Trennung von exokrinem und endokrinem Gewebe wieder in die Spritze gezogen und herausgepreßt wird, das letzte Mal über ein Plastikteesieb in einen mit eiskalter Hanks-Lösung gefüllten 25 ml Meßzylinder.
Hier setzen sich auf Grund ihres unterschiedlichen Gewichtes die Langerhansschen Inseln schneller auf dem Boden ab, während die exokrinen Gewebestücke oben schwimmen und abgesaugt werden können. Dieses Waschen wird fünf - bis sechsmal wiederholt,

bis der Überstand klar ist. Nun werden die Inseln in kleine Schälchen gegossen und unter dem Stereomikroskop mit einer Mikropipette in ein Sammelschälchen sortiert.
Diese Methode der Gewinnung von Langerhansschen Inseln wurde von Lacy und Kostianovsky (35) beschrieben.

2.7.2 Herstellung der KRB-Lösung für die Inkubation der Inseln (Zusammensetzung s. 2.3.1)

Von den Stammlösungen werden folgende Mengen genommen und gemischt:

Lösung "A"	10 ml
Lösung "B"	10 ml
Lösung "C"	10 ml
Aqua dest.	70 ml

Anschließend wird ca. 5 Minuten mit Carbogen (95 % O_2 / 5 % CO_2) begast, dann 2 % Rinderalbumin zugegeben und der pH-Wert auf 7,35 eingestellt.

2.7.3 Vorinkubation

Die isolierten Inseln werden in 3-4 ml der Vorinkubationslösung (KRB-Lösung, pH 7,35) eingebracht, die Glucose in substimulatorischer Menge von 0,3 mg/ml enthält.
Das Inkubationsgläschen wird mit einem Gummistopfen verschlossen, in ein Wasserbad von 37 ^{o}C gestellt, begast und leicht geschüttelt. Die Vorinkubation dauert 30 Minuten. Sie dient der Stoffwechselregeneration nach dem Isolierungsprozeß.

Sie wird gestoppt, indem man das Gläschen mit den Inseln in Eiswasser stellt, die Nährlösung mit einer kleinen Spritze abnimmt und mit eisgekühlter Hanks-Lösung nachwäscht. Dieser Vorgang wird drei - bis viermal wiederholt. Von den Inseln während der Vorinkubation freigesetztes oder aus beschädigten Zellen ausgelaufenes Insulin wird auf diese Weise aus dem Medium und von den Inseln entfernt.

2.8 Bestimmung der Aktivität des PPS

Die Bestimmung der PPS Aktivität wird nach der Methode von Katz und Wood (36) durchgeführt, dazu müssen die folgenden drei Parameter gemessen werden:

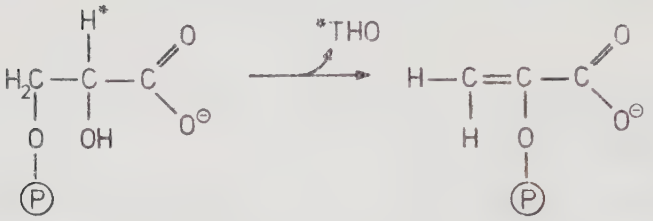
1. die THO Bildung aus $\left[5\text{-}^{3}H\right]$ Glucose,
2. die $^{14}CO_2$ Bildung aus $\left[1\text{-}^{14}C\right]$ Glucose,
3. die $^{14}CO_2$ Bildung aus $\left[6\text{-}^{14}C\right]$ Glucose.

Die THO Messung dient zur Bestimmung der Glucoseutilisation, die Messungen von $^{14}CO_2$ zur Bestimmung der Glucoseoxidation. Welches Prinzip den Bestimmungsmethoden zugrunde liegt und über welchen Reaktionsablauf in der Glykolyse bzw. im PPS die Abspaltung von THO bzw. $^{14}CO_2$ erfolgt, soll im folgenden Abschnitt gezeigt werden.

2.8.1 THO-Bildung aus $\left[5\text{-}^{3}H\right]$ Glucose

Mit dieser Bestimmung wird der Glucoseabbau sowohl über die Glykolyse als auch über den Pentosephosphatshunt erfasst.

Die Abspaltung des am C-5 Atom der Glucose radioaktiv markierten Wasserstoffatoms erfolgt in der Glykolyse bei der Bildung von Phosphoenolpyruvat aus 3- Phosphoglycerat. Das Wasserstoffatom wird dabei eingebaut in Wasser, d.h. als THO freigesetzt.



3 - Phosphoglycerat Phosphoenolpyruvat

So wird pro Molekül Glucose, das über die Glykolyse abgebaut wird, ein Molekül THO gebildet.

Der Glucoseabbau, der über den Pentosephosphatshunt abläuft, wird ebenfalls mit Hilfe des oben beschriebenen Reaktionsschrittes bestimmt.
Das ist deswegen möglich, da im PPS u.a. Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. Fructose-6-phosphat als Reaktionsprodukte entstehen. Diese werden - da sie auch Zwischenprodukte der Glykolyse sind - in die Glykolyse eingeschleust und dort weiter abgebaut.
Glycerinaldehyd-3-phosphat sowie Fructose-6-phosphat haben die C-Atome 4,5,6 der eingesetzten Glucose in ihrem Molekül,

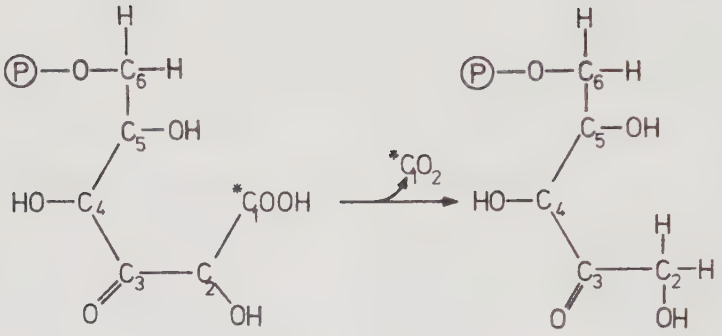
sodaß bei der Abspaltung von THO bei der eingangs beschriebenen Reaktion wiederum das Tritiumisotop des C-5 Atoms der Glucose erfasst wird.

Beleuchtet man den quantitativen Aspekt dieser Bestimmungsmethode, so kann auch hier gesagt werden, daß 1 Molekül THO einem Molekül Glucose entspricht, denn über den Glucoseabbauweg des PPS wird entweder nur Glycerinaldehyd-3-phosphat oder nur Fructose-6-phosphat aus einem Molekül Glucose gebildet.

2.8.2 $^{14}CO_2$ Bildung aus $[1\text{-}^{14}C]$- und aus $[6\text{-}^{14}C]$ Glucose

Durch den Einsatz von $[6\text{-}^{14}C]$ Glucose kann der Anteil der Glykolyse, durch $[1\text{-}^{14}C]$ Glucose der Anteil der Glykolyse und des PPS an der Glucoseoxidation gemessen werden.

Im Pentosephosphatshunt wird nur das radioaktiv markierte C-1 Atom der Glucose als $^{14}CO_2$ abgespalten und zwar bei folgendem Reaktionsablauf:
3-Ketogluconsäure-6-phosphat wird im PPS durch Decarboxylierung in Ribulose-5-phosphat übergeführt.
Wird dagegen ein am C-6 Atom markiertes Glucosemolekül über den PPS abgebaut, so gelangt es als Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. Fructose-6-phosphat zur Glykolyse und wird dort weiter metabolisiert.



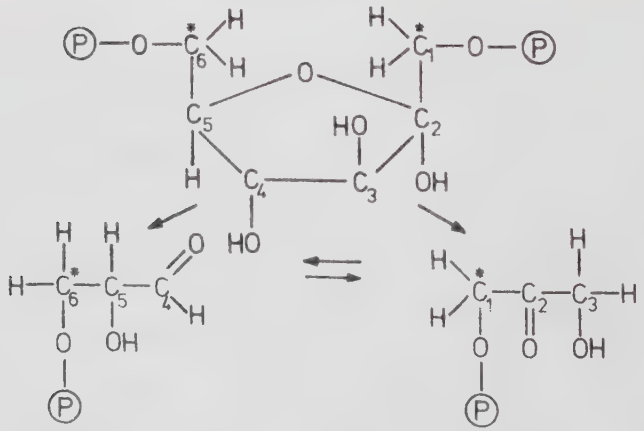
3-Ketogluconsäure-6-phosphat

Ribulose-5-phosphat

Im Gegensatz zum PPS sind in der Glykolyse durch den Abbau zu Triosen das C-1 und das C-6 Atom der Glucose nicht mehr zu unterscheiden.

Fructose-1,6-biphosphat wird in Dihydroxy-aceton-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, zwei isomere Produkte, aufgespalten. Der weitere Abbau erfolgt jedoch nur über das Glycerinaldehyd-3-phosphat.

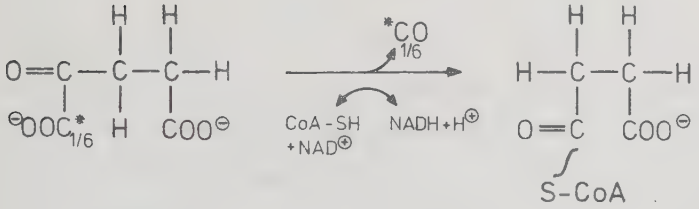
Fructose -1,6- biphosphat



Glycerinaldehyd-3-phosphat

Dihydroxy-aceton-phosphat

Die Abspaltung des C-1 bzw. C-6 Atoms der Glucose erfolgt jedoch erst im Citronensäurezyklus bei der Bildung von Succinat über Succinyl-CoA aus ∝ - Ketoglutarat.



∝-Ketoglutarat

Succinyl - CoA

Auf Grund der beschriebenen Abbauschritte ist somit zusammenzufassen, daß das Pyruvat, das im Citronensäurezyklus weiter abgebaut wird, entweder aus Glucose stammt, die die gesamte Glykolyse über Fructose-1-phosphat, Fructose-1,6-biphosphat u.s.w. durchlaufen hat oder aus Glucose, die im PPS abgebaut wurde und entweder als Glycerinaldehyd-3-phosphat oder als Fructose-6-phosphat mit den C-Atomen 4,5,6 und zum Teil ohne das C-Atom 1 (vorherige Abspaltung als CO_2) in den Abbauweg der Glykolyse eingeschleust wurde. Diese Verzahnung der beiden Abbauwege ist bei der Berechnung des Anteils des PPS an der Glucoseoxidation zu berücksichtigen.

2.8.3 Quenchkurven

a) Prinzip

Das Prinzip der Messung radioaktiver Strahlung im Flüssig-Szintillations-Zähler ist, daß die Energie der Elektronen - wir messen bei unseren Versuchen ß-Strahlung - von Szintillatoren (meist organische Verbindungen) absorbiert und zum Teil in Fluoreszenzstrahlung umgewandelt wird. Die Energie dieser Strahlung wird im Gerät auf Photoelektronen übertragen und - um zu meßbaren Beträgen zu kommen - dort vervielfacht.

Durch den Zusatz in unserem Fall von Säuren, Salzen, Albumin etc. kann ein Teil der Fluoreszenzstrahlung vom Gerät nicht erfasst werden, d.h. ihr Effekt wird gelöscht bzw. gequencht.

Da jedoch nicht die gemessenen Zerfälle pro Minute (cpm = counts per minute) einer radioaktiven Strahlung, sondern die tatsächlichen Zerfälle pro Minute (dpm = disintegrations per minute) interessieren, ist der Löscheffekt in der jeweiligen Probe zu bestimmen. Zu diesem Zwecke werden Quenchkurven erstellt.

Jede Probe im Flüssig-Szintillations-Zähler wird gegen Barium 133 als einem externen Standard verglichen. Der dabei ermittelte Wert des externen Standards = ESR (external standard ratio) ist ein indirektes Maß für den Quench-, d.h. Löscheffekt in dieser Probe.

Die Unterschiede im Quencheffekt zwischen den einzelnen Proben kommen zustande durch unterschiedliche Volumina des zugesetzten Wassers bzw. Hyamins®, durch das Vorhandensein von KRB-Albuminlösungen bzw. den 10 %igen Zusatz an N-HCl.

b) Durchführung

Für Tritium werden Quenchkurven mit einem Tritiumstandard aufgestellt, dessen Aktivität 0,25 mCi/0,04 mg beträgt.

25 µl der wäßrigen Lösung des Standards werden pro Probe eingesetzt. Dies entspricht 1,5 ng bzw. 20 625 dpm. Berechnung: Tritium-Standard (0,25 mCi/0,04 mg): 25 µl ≙ 1,5 ng ≙ 9 375 nCi = 20 625 dpm.

Für die Quenchkurven der ^{14}C-Messungen wird ein Standard von ^{14}C eingesetzt, dessen Aktivität 0,6 µCi/ml beträgt. Pro Probe werden 100 µl der Lösung verwendet ≙ 0,06 µCi = 132 000 dpm.

Für die ^{3}H - sowie die ^{14}C - Messungen müssen je 2 Quenchkurven ermittelt werden.
Die eine bestimmt den Quencheffekt im äußeren = Szintillationsgefäß. Zu 10 ml der Szintillationslösung (auf Dioxan- bzw. auf Toluol Basis) werden unterschiedliche Mengen -- zwischen 0 und 5 ml -- an Wasser bzw. Hyaminhydroxid zugesetzt und die Aktivität dieser Proben dann ca. 100 Minuten im LSC gezählt.

Die andere Quenchkurve wird für die Messungen des Absolutwertes = Inhalt des Inkubationsgläschens aufgestellt. Den 10 ml der Bray-Szintillationslösung (Dioxan-Basis) werden 0 bis 5 ml einer Mischung aus KRB-Albuminlösung mit Glucose und 10 %igem N-HCl-Zusatz zupipettiert, d.h. diese Lösung ist genau wie die Inkubationslösung zusammengesetzt. Die Aktivität der Probe wird im LSC bestimmt.

c) Auswertung

Die solchermaßen ermittelte Aktivität der Proben, d.h. die cpm, die der Kanal A des LSC ausdruckt, wird dividiert durch die oben errechneten Werte der absoluten Aktivität (von 20 625 dpm des Tritium- bzw. 132 000 dpm des ^{14}C-Standards) und dieser Quotient als % η = "efficiency" angegeben. In ein Koordinatensystem mit % η als Ordinate und ESR als Abszisse werden die errechneten % η einer Probe zu dem ebenfalls vom LSC-Gerät ausgedruckten, zugehörigen ESR-Wert abgetragen. Man erhält so die gewünschten Quenchkurven.

Abbildung 2 zeigt die Quenchkurve von Tritium (^3H), Abbildung 3 die von ^{14}C.
In beiden Abbildungen gilt die Kurve O für das äußere Gefäß, das Szintillationsgläschen, die mit ● bezeichnete Kurve für das innere, das Inkubationsgläschen.

Quenchkurven werden später zum Ablesen der % η, d.h. des Löscheffektes gebraucht, indem man zum jeweils ausgedruckten ESR-Wert einer Probe den zugehörigen % η - Wert aufsucht.

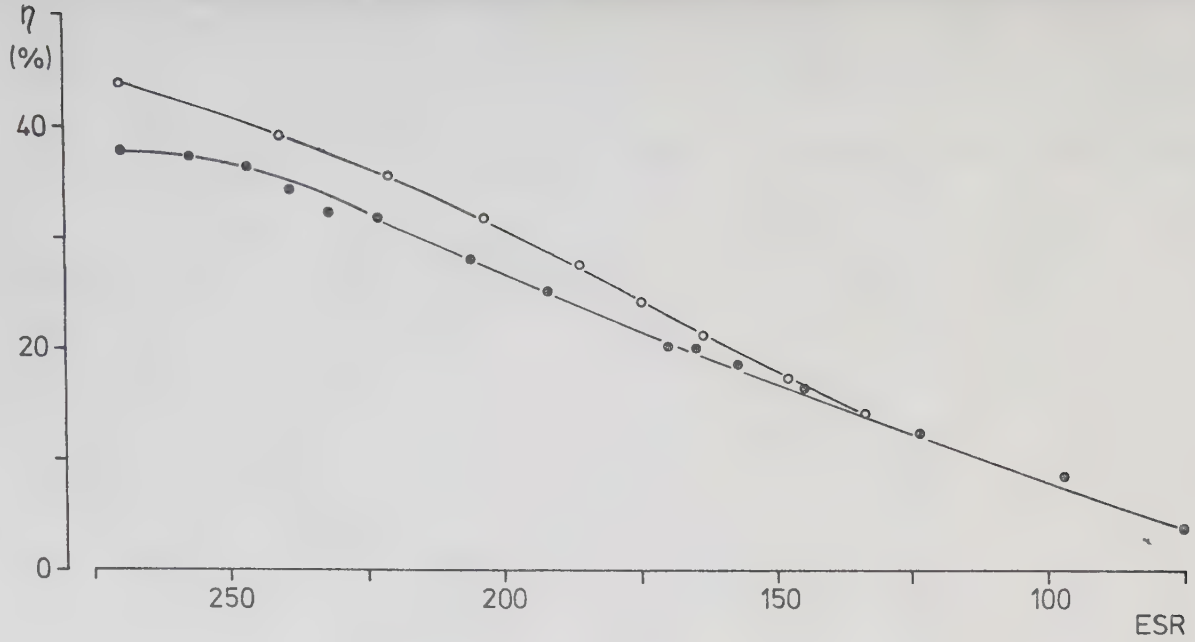


Abb. 2: QUENCHKURVEN für ^{3}H

Abhängigkeit des externen Standards (ESR) vom Löscheffekt in der Probe, berechnet als % η = "efficiency".
Die mit (o-o) bezeichnete Kurve gilt für den Löscheffekt in der THO Probe, die mit (●-●) bezeichnete Kurve für den Löscheffekt bei den Absolutwerten, d.h. bei der $\left[5\text{-}^{3}H\right]$ Glucose - Lösung.

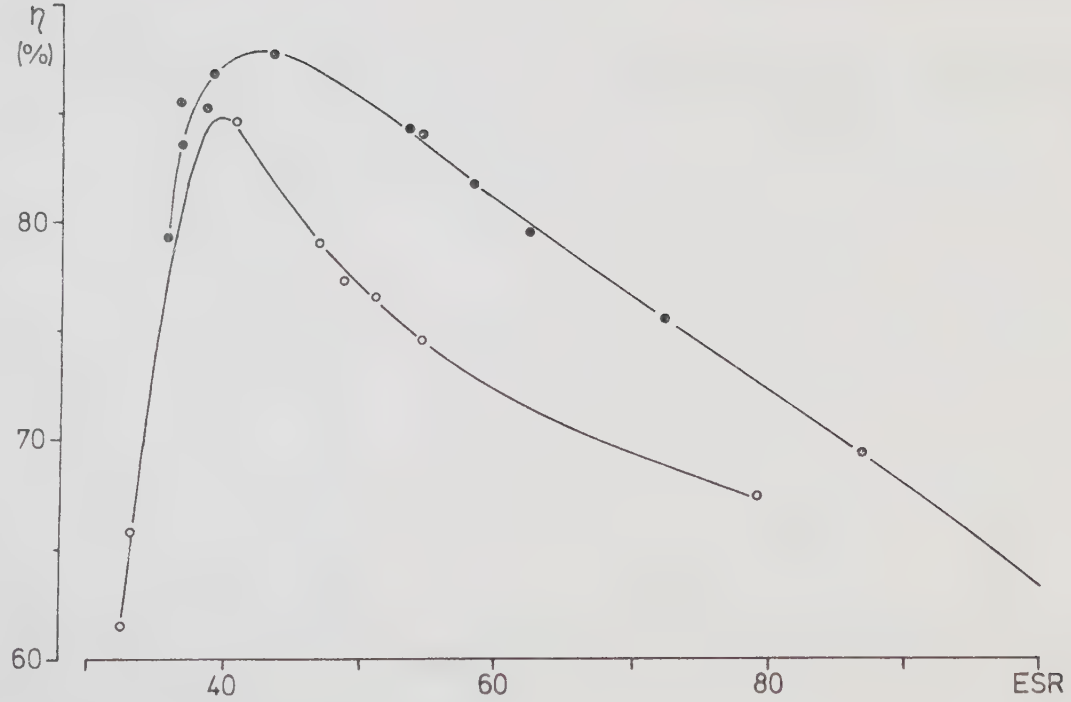


Abb. 3: QUENCHKURVEN für ^{14}C

Abhängigkeit des externen Standards (ESR) vom Löscheffekt in der Probe, berechnet als % η = "efficiency".

Die mit (o-o) bezeichnete Kurve gilt für den Löscheffekt in den $^{14}CO_2$ Proben, die mit (●-●) bezeichnete Kurve für den Löscheffekt bei den Absolutwerten, d.h. bei der $\left[1\text{-}^{14}C\right]$- bzw. der $\left[6\text{-}^{14}C\right]$Glucose - Lösung.

Die im Kanal A gezählten Zerfälle pro Minute werden mit 100 multipliziert und durch den Wert % η dividiert. Der errechnete Wert entspricht den tatsächlichen Zerfällen pro Minute (dpm). Diese werden sowohl für die THO- bzw. $^{14}CO_2$ - Messungen als auch für die jeweils zugehörigen Absolutwerte ermittelt.

2.8.4 Berechnung des Pentosephosphatshunts (PPS)

Um die Berechnung durchführen zu können, in welchem Maße der PPS an der Glucoseoxidation beteiligt ist, ist zuerst die Glucoseutilisation zu bestimmen, d.h. der Glucoseabbau sowohl über den PPS als auch über die Glykolyse. Zu diesem Zweck werden - wie später genauer beschrieben - Untersuchungen mit $\left[5\text{-}^3H\right]$ Glucose nach der Methode von Ashcroft et al. (37) durchgeführt und das entstandene THO gemessen.

2.8.4.1 Berechnung der Glucoseutilisation

1.) Da man davon ausgeht, daß sich zwischen dem Wasser im Szintillationsgläschen (2 ml) und dem Inkubationsmedium (1,1 ml) ein Gleichgewicht im Gehalt an THO einstellt, ist zu beachten, daß 100 % = 3,1 ml entsprechen und in 2 ml folglich nur 64,5 % THO aufgefangen sind. Die gemessenen cpm (counts per minute) der Probe sind mit dem Faktor 1,55 zu multiplizieren.
2.) Um die tatsächlichen Zerfälle pro Minute (dpm) zu ermitteln, werden die nach Punkt 1) errechneten Werte

sowie die Zählrate der Absolutwerte durch die in den Quenchkurven ermittelte "efficiency" = % η = Zählausbeute in % dividiert.

$$dpm = \frac{cpm \times 100}{\% \eta}$$

3.) Als weiteres erfolgt die Subtraktion der "background" - Werte (Proben gleichbehandelt wie alle übrigen, jedoch ohne Zusatz an Inseln) von denen der Versuchsreihe.

4.) Die spezifische Aktivität der $\left[5\text{-}^3H\right]$ Glucose wird errechnet durch Division der zuvor ermittelten Zerfälle pro Minute (dpm) der Absolutwerte durch pmol der Gesamtglucose im Medium.

5.) Die Glucoseutilisation wird errechnet, indem die Zerfallsrate an THO durch die spezifische Aktivität der Glucose dividiert wird.

$$\text{pmol Glucoseutilisation} = \frac{\text{dpm (THO)}}{\text{spez. Aktivität (dpm/pmol)}}$$

Dieses Ergebnis wird später in die Berechnung des PPS mit eingebracht.

2.8.4.2 Berechnung der Glucoseoxidation

Der prozentuale Anteil des Pentosephosphatshunts an der Glucoseoxidation wird nach den Ausführungen von Katz und Wood (36) berechnet.

Grundlagen

Die Problematik der Berechnung der Abbauwege von Glucose liegt in folgenden Punkten:

1.) im Pentosephosphatshunt wird unter anderem Fructose-6-phosphat gebildet, das durch die Phosphohexoisomerase zu Glucose-6-phosphat zurückgebildet werden kann,

2.) neben dem PPS und dem Embden-Meyerhof - Abbau können Kohlenhydrate durch "Nontriose Phosphat Pathways" (Bildung von Glykogen, Lactose, Glucosamin, Glucoroniden) abgebaut werden,

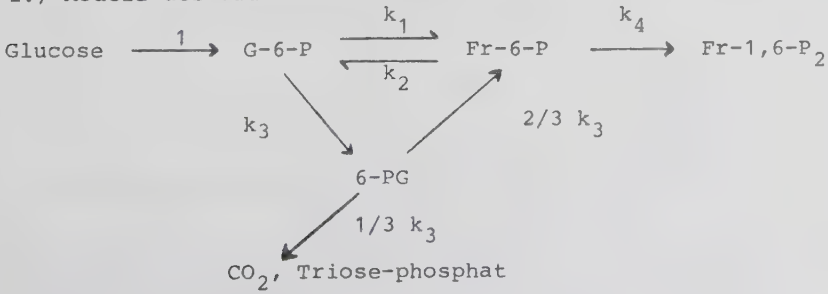
3.) die Oxidation der Triosephosphate zu CO_2 ist im allgemeinen unvollständig.

Diese Gründe führten dazu, folgendes Modell für den Glucose-Abbau zu entwerfen:

1.) Der gesamte Pentosephosphatshunt läßt sich auf eine "Netto-Formel" bringen:

3 Glucose-6-phosphat $\longrightarrow$ 3 CO_2 + 1 Glyceraldehyd-3-phosphat
+ 2 Fructose-6-phosphat

2.) Modell des Glucose-Abbaus



Zusammengefaßt ergibt sich daraus die Formel:

Glucose-Einstrom = Glucose-Ausstrom = 1 = 1/3 k_3 + k_4 = PC + EMP

PC = Pentose Cycle = Pentosephosphatshunt

EMP = Embden-Meyerhof-Pathway = Embden-Meyerhof-Abbau

Den weiteren Berechnungen wird zugrunde gelegt, daß die Phosphohexose-Isomerase in genügend großer Menge vorhanden ist und ihre Reaktion so schnell abläuft, daß die beiden Hexose-Phosphate als ein Pool angesehen werden können. Außerdem wird mit der Annahme gearbeitet, k_2 sei Null, woraus sich die Formel ableiten läßt:

Glucose-Einstrom = Glucose-Ausstrom = 1 = k_3 + k_1 = PC + EMP

Durch diese Arbeitshypothesen kann ein "Hexose Pool" geschaffen werden, von dem aus die Reaktionen des PC bzw. EMP ablaufen.

Als weitere Punkte für die Berechnung sind zu beachten:

1.) der "Verdünnungseffekt", den die $\left[1\text{-}^{14}C\right]$Glucose durch das Recycling erfährt (siehe Grundlagen Punkt 1)

2.) die daraus folgende Einführung des Begriffes "spezifische Aktivität" für die einfließende Glucose. Sie wird für $\left[1\text{-}^{14}C\right]$Glucose = (1+2 PC) x α_1 , für 6-^{14}C Glucose = α_6 angegeben.

α_1 und α_6 = spezifische Aktivität der Hexose-6-phosphate aus $\left[1\text{-}^{14}C\right]$ - bzw. $\left[6\text{-}^{14}C\right]$ Glucose.

3.) die Glucoseutilisation, sie wird bei der Berechnung des "specific yield" = Quotient aus oxidierter Glucose/ Glucoseverbrauch berücksichtigt.

Aus diesen Parametern und Arbeitshypothesen erhält man dann die endgültige Formel, nach der wir den prozentualen Anteil des PPS an der Glucoseoxidation berechneten:

$$\frac{sy\ (C\text{-}1) - sy\ (C\text{-}6)}{1 - sy\ (C\text{-}6)} = \frac{3\ PC}{1 + 2\ PC} \qquad (1)$$

sy (C-1) = specific yield aus Oxidation der [1-^{14}C] Glucose
sy (C-6) = specific yield aus Oxidation der [6-^{14}C] Glucose

Durchführung

1.) Mittels des ESR (external standard ratio) wird aus vorher aufgestellten Quenchkurven die "efficiency"= % η = Zählausbeute in % jeder Probe ermittelt.

2.) Den Meßwert multipliziert man mit 100 und dividiert durch % η, um aus den vom Zählgerät angegebenen counts per minute (cpm) die tatsächlichen Zerfälle pro Minute (dpm) zu errechnen. Bei den Absolutwerten ist außerdem der Meßwert mit 11 zu multiplizieren, da nur der 11.Teil zur Messung eingesetzt wurde.

$$dpm = \frac{cpm\ \ (Kanal\ A)\ \ x\ \ 100}{\%\ \eta}$$

3.) Subtraktion der "background"-Werte (Proben gleichbehandelt wie alle übrigen, jedoch ohne Zusatz von Inseln) von denen der Versuchsreihe.

4.) Die errechneten dpm Angaben der Absolutwerte werden durch pmol Gesamtglucose dividiert, man errechnet so die "spezifische Aktivität" der einfließenden Glucose.

5.) Die Angabe der pmol oxidierter Glucose erhält man durch Division der gemessenen Zerfälle von $^{14}CO_2$ durch den Wert der spezifischen Aktivität.

$$\text{pmol oxidierte Glucose} = \frac{\text{dpm } (^{14}CO_2)}{\text{dpm/pmol (spez. Aktivität)}}$$

6.) Berechnung "specific yield" = $\frac{\text{pmol Glucose oxidiert}}{\text{pmol Glucoseverbrauch}}$

7.) Die getrennt für $\left[1\text{-}^{14}C\right]$- und $\left[6\text{-}^{14}C\right]$ Glucose berechneten Werte bzw. je der Mittelwert aus einer gleichen Versuchsanordnung werden eingesetzt in die Formel (1) und die Gleichung nach PC = PPS aufgelöst. Der errechnete Betrag ist mit 100 zu multiplizieren, um den Prozentsatz PPS zu erhalten.

2.8.5 Herstellung der Inkubationslösungen

Bei den $^{14}CO_2$ - und den THO - Bestimmungen enthält das Inkubationsmedium neben unmarkierter auch radioaktiv markierte Glucose.
Aus diesem Grund hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Inkubationslösungen zu teilen. In 0,5 ml wässriger Lösung = Inkubationslösung I werden 3 µCi/ml radioaktiv markierte $\left[1\text{-}^{14}C\right]$- bzw. $\left[6\text{-}^{14}C\right]$ Glucose bzw.6 µCi/ml radioaktiv markierte $\left[5\text{-}^{3}H\right]$ Glucose einpipettiert. Die restlichen 0,5 ml des Inkubationsmediums = Inkubationslösung II bestehen aus einer KRB-Lösung und darin sind unmarkierte Glucose, entsprechend den Konzentrationsangaben in den Tabellen und

Rinderalbumin gelöst. Alle Substanzen sind in Konzentrationen enthalten, wie sie für 1 ml Inkubationsmedium benötigt werden.

Die Inkubationslösung II muß immer in Eiswasser stehen, um eine Kontamination mit Bakterien und deren Vermehrung in Grenzen zu halten, da sie durch Verstoffwechselung der Glucose während der Inkubation eine erhöhte CO_2 Produktion der Inseln vortäuschen.

2.8.6 Versuchsbedingungen und Versuchsablauf

2.8.6.1 Versuchsbedingungen

Die Aktivität des PPS wird unter verschiedenen Inkubationsbedingungen gemessen.

1.) 15 Langerhanssche Inseln werden in 0,15 ml Medium 180 Minuten lang inkubiert und die Abhängigkeit der Aktivität des PPS von verschiedenen Glucosekonzentrationen (5,6; 11,1 oder 16,7 mM) bestimmt.
Diese Versuchsserie gilt der Wiederholung und Vervollständigung von Untersuchungen, die bereits früher in diesem Labor durchgeführt worden sind. Außerdem soll sie zum Vergleich und zur Bestätigung der Ergebnisse anderer Autoren dienen, die keine Abhängigkeit der PPS Aktivität von der Glucosekonzentration finden konnten. Wir vermuten, daß die Akkumulation von Insulin, bedingt durch die gewählte Versuchsanordnung, zu diesen negativen Ergebnissen geführt hat.

2.) In der zweiten Versuchsserie werden 5 isolierte Langerhanssche Inseln in 1 ml Medium 90 Minuten lang inkubiert,

ebenfalls unter Zusatz verschiedener Glucosekonzentrationen (5,6 oder 16,7 mM).
Diese Bedingungen entsprechen den in diesem Labor üblichen. Dabei soll die Konzentration an Insulin im Medium vermindert und die Möglichkeit einer Hemmwirkung des Insulins auf seine eigene Sekretion sowie auf die PPS-Aktivität eingeschränkt werden.

3.) und 4.) In diesen Versuchsserien erfolgt der Einsatz von Insulin-Antiserum (GPAIS = guinea pig anti-insulin serum), wobei bei Versuchsserie 3 die GPAIS-Menge konstant gehalten wird (Bindung von 800 µE IRI), jedoch die Glucosekonzentrationen verändert werden (5,6; 11,1 oder 16,7 mM).
Bei Versuchsserie 4 hingegen ist die Glucosekonzentration konstant (16,7 mM), während der Zusatz an GPAIS variiert wird (Bindung von 400 bzw. 800 µE IRI).
Bei beiden Versuchsserien werden jeweils 5 isolierte Inseln in 1 ml Medium 90 Minuten lang inkubiert.
Der GPAIS-Zusatz dient dazu, von den Inseln sezerniertes Insulin im Medium abzufangen und damit die Konzentration an freiem, reaktivem Insulin klein zu halten. Unter diesen Bedingungen kann man davon ausgehen, daß eine Hemmwirkung des Insulins auf den Glucoseabbau über den PPS und auf die Insulinsekretion vollständig unterbunden und ausgeschaltet wird.

Detaillierte Angaben zu den Versuchen finden sich in den jeweiligen Tabellen.

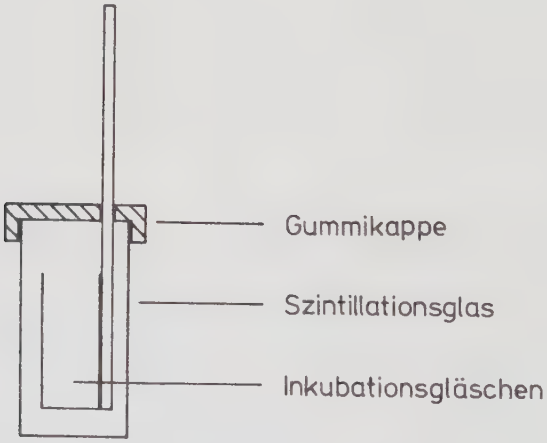
2.8.6.2 Versuchsablauf

Die THO-Bestimmung wird nach der Methode von Ashcroft et al. (37) durchgeführt.
Je nach Versuchsanordnung werden fünfzehn oder fünf der isolierten Langerhansschen Inseln in kleine Glasgefäße (11 x 25 mm) gebracht, die in Eiswasser stehen. Zwei der zehn Gläschen erhalten keine Inseln, sie dienen zur Bestimmung des "backgrounds". Sofort werden 0,075 ml bzw. 0,5 ml Inkubationslösung II einpipettiert. Sie enthält die unmarkierte Glucose in den für die jeweilige Versuchsreihe gewählten Konzentrationen.

In Versuchsreihe 3 und 4 (siehe Abschnitt Versuchsbedingungen) erfolgt außerdem der Zusatz des Insulin-Antiserums. Dafür wird das gefriergetrocknete Antiserum so gelöst, daß 10 bzw. 20 µl dieser Lösung 400 bzw. 800 µE IRI zu binden vermögen.
In Versuchsserie 4 ist zur Kontrolle anstatt GPAIS zwei weiteren Inkubationsgläschen Normalserum, d.h. Serum ohne Antikörper zuzugeben.

Zu allen Gläschen wird dann die radioaktiv markierte Glucose = Inkubationslösung I in Form einer wässrigen Lösung von $\left[5\text{-}^{3}H\right]$ Glucose zupipettiert. Nun werden die Inkubationsgläschen aus dem Eisbad genommen und vorsichtig abgetrocknet.

Durch das kleine Loch in einer Gummikappe war zu Beginn des Versuches der ca. 8-10 cm lange "Stiel" des Inkubationsgläschens durchgezogen worden. Nun wird diese Gummikappe ziemlich weit heruntergeschoben, umgebogen und über den Rand eines zweiten Gläschens = Szintillationsglas (20 x 40 mm) gestülpt. Das Inkubationsgläschen hängt nun in diesem Szintillationsglas, gehalten durch die Gummikappe.



Durch die Gummikappe werden 2 Kanülen gestochen, über die die Inkubationslösung und die Inseln mit Carbogen begast werden. Nach 10 Minuten werden die Kanülen entfernt und in einem Wasserbad bei 37 ^{o}C und mäßiger Bewegung (Frequenz 72) die Inkubation durchgeführt. Die Inkubationszeit beträgt 90 Minuten zusätzlich 15 Minuten Anwärmzeit, das ist die Zeit, die die Wärme braucht, um von außen zum inneren Glas vorzudringen.

Nach 105 Minuten werden die Gläser aus dem Wasserbad genommen, in das äußere Gefäß 2 ml Wasser und, um die Reaktion zu stoppen, in das innere Gläschen 100 µl 1 N HCl eingespritzt.
Die Gläschen werden bei Raumtemperatur 24 Stunden vorsichtig geschüttelt, damit sich ein Gleichgewicht zwischen THO und Wasser einstellen kann.

Danach wird die Gummikappe mit dem Inkubationsgefäß vom Szintillationsgläschen abgenommen und man füllt in dieses 10 ml Bray-Szintillationslösung (auf Dioxan-Basis). Das Gläschen wird mit einem Schraubdeckel verschlossen und die radioaktive Strahlung 100 Minuten lang in einem automatischen "liquid scintillation counter" (LSC) gemessen. Man erhält das Ergebnis über zwei Kanäle ausgedruckt, außerdem wird die Probe gegenüber einem externen Standard verglichen.

Der absolute Gehalt der Probe, d.h. die radioaktive Strahlung der eingesetzten $\left[5\text{-}^{3}H\right]$ Glucose-Lösung, die sich im Inkubationsgläschen befindet, wird gemessen, indem man 100 µl Inkubationsmedium aus dem inneren Gläschen entnimmt, 10 ml Bray-Szintillationslösung dazugibt und die Radioaktivität der Probe im LSC zählt.

Die $^{14}CO_2$ - Bestimmung wird nach der Methode von Keen et al. (38) ausgeführt.
Der Versuchsablauf ist mit dem der THO-Bestimmung identisch, so daß hier nur die Änderungen bei den verwendeten Reagenzien und Lösungen aufgeführt sind.

1.) Die Inkubationslösung I ist eine wäßrige Lösung von $[1\text{-}^{14}C]$- bzw. $[6\text{-}^{14}C]$ Glucose.

2.) In das Szintillationsgläschen wird anstatt Wasser 1 ml Hyaminhydroxid eingespritzt, das zum Neutralisieren des im Inkubationsgläschen gebildeten CO_2 dient. Die Reaktion im Inkubationsgläschen wird ebenfalls wie bei der THO-Bestimmung mit 100 µl 1 N HCl gestoppt.

3.) Da bei dieser Bestimmung das gebildete CO_2 neutralisiert wird, braucht man nicht wie bei der THO-Bestimmung abzuwarten, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, sondern läßt die Gläschen 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen. Es kann erwartet werden, daß in dieser Zeit das gebildete CO_2 vollständig im Hyaminhydroxid aufgefangen worden ist.

4.) Die Messung der radioaktiven Strahlung der Proben erfolgt ebenfalls wie bei der THO-Bestimmung beschrieben, jedoch werden 10 ml Szintillationslösung auf Toluol-Basis zugesetzt, mit der sich das Hyaminhydroxid vermischt. Die Messung der Absolutwerte erfolgt analog zu den Ausführungen bei der THO-Bestimmung.

2.9 Messung der Insulinsekretion

2.9.1 Versuchsbedingungen

Als Stammlösung dient die in Abschnitt 2.6.2 beschriebene KRB-Lösung, der je nach Fragestellung unterschiedliche Konzentrationen an Glucose bzw. GPAIS (guinea pig anti-

insulin serum) bzw. verschiedene, die Insulinsekretion stimulierende Substanzen zugesetzt werden. Der pH-Wert wird auf 7,35 justiert.

Inkubiert werden 5 bzw. 15 isolierte Langerhanssche Inseln in 1,0 bzw. 0,15 ml über 90 bzw. 180 Minuten in einem auf 37 ^{o}C thermostatierten Wasserbad und dabei mit Carbogen (95 % O_2 / 5 % CO_2) begast.

Durch Einstellen der Gläschen in Eiswasser wird die Inkubation beendet. Vom Inkubationsmedium werden 100 µl abgenommen und bei -20 ^{o}C eingefroren, um auf diese Weise die Proben bis zur Bestimmung zu lagern.

2.9.1.1 Untersuchungen mit Insulin-Antiserum

Analog den vier in Abschnitt 2.8.6.1 aufgeführten Versuchsserien werden Bestimmungen zur Insulinsekretion durchgeführt.

Die Insulinbestimmungen der Versuchsreihen 1 und 2 sind gegenüber den oben genannten Inkubationsbedingungen nicht abgeändert worden, dagegen erfordert der Zusatz von Insulin-Antiserum eine modifizierte Behandlung der Proben, die hier beschrieben werden soll.

Je 5 Inseln werden in ein Gläschen gegeben und je 1 ml Inkubationslösung (2.6.2) dazu einpipettiert. Dabei wird entweder die Glucosekonzentration des Inkubationsmediums variiert und/oder 10 bzw. 20 µl einer wässrigen Lösung des lyophilisierten Antiserums zugetropft, die 400 bzw. 800 µE Insulin zu binden vermögen. Zu den Kontrollwerten

wird dieselbe Menge Normalserum zugesetzt. Die Inkubation dauert 90 Minuten.
Zur Abtrennung des Antikörpers und zur Insulinbestimmung s. 2.9.2.1.

2.9.1.2 Untersuchungen mit Exogenem Insulin

In der KRB-Stammlösung werden neben Glucose (5,6 oder 11,1 mM) jeweils folgende Substanzen gelöst:

Tolbutamid (Na-Salz)	0,1 mg/ml
Aminophyllin (= Theophyllin-aethylendiamin)	10 mM
Arginin•HCl	10 mM
Leucin	10 mM

p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) dagegen wird in Form konzentrierter Lösungen dem Inkubationsmedium zugegeben, da es sich nur im stark alkalischen Milieu (pH 11) löst. Die Inkubationslösungen sind deswegen auf pH 7,0 einzustellen und kurz vor Verwendung nochmals genau nachzumessen und evt. neu zu justieren. Nach Zusatz der p-CMB - Lösung erhält man einen pH-Wert der fertigen Inkubationslösung von 7,3 - 7,4.

Zu allen Versuchen werden je 5 isolierte Langerhanssche Inseln pro Probe verwendet, zu denen 1 ml Inkubationslösung gegeben wird.

Die Inkubationszeit beträgt bei den Versuchen mit p-CMB 30 Minuten, bei allen übrigen 90 Minuten.

Exogenes Insulin wird in Konzentrationen von 100, 200, 400 oder 800 µE/ml zu den Proben pipettiert, das entspricht 2,5 bzw. 5,0 bzw. 10,0 bzw. 20,0 µl einer Insulin-Stammlösung von 40 mE/ml.

Die zugegebene Insulinmenge wird in jedem Versuch erneut bestimmt, indem man Insulin zu 1 ml Inkubationslösung gibt, aber ohne Inseln inkubiert. Dadurch werden die durch die Versuchsanordnung bzw. -durchführung bedingten Einflüsse berücksichtigt.

Für alle Versuchsserien ergibt sich folgender Versuchsaufbau, hier am Beispiel der mit Leucin (10 mM) durchgeführten Untersuchungen aufgezeigt:

Bezeichnung	Anzahl der Inseln	Glucose (5,6mM)	Leucin (10mM)	Exogenes Insulin (µE/ml) 100	200	400	800
A	5	+	--	--	--	--	--
B	5	+	+	--	--	--	--
C	5	+	+	+	--	--	--
D	5	+	+	--	+	--	--
E	5	+	+	--	--	+	--
F	5	+	+	--	--	--	+
G	0	+	+	+	--	--	--
H	0	+	+	--	+	--	--
I	0	+	+	--	--	+	--
K	0	+	+	--	--	--	+

2.9.2 Bestimmungsmethode für Insulin

a) Meßmethode und Prinzip

Die Untersuchungen werden nach der Doppelantikörper-Methode von Söldner u. Slone (39) durchgeführt. Dazu steht ein fertiger Reagenziensatz (INSIK - 1®) zur Verfügung. Die Verdünnungsreihe für die Eichkurve wird mit Ratteninsulin hergestellt.
Die Werte der Proben ermitteln sich aus Doppel- und Dreifachbestimmungen.

b) Durchführung

Je 100 µl Inkubationsmedium waren aus den verschiedenen Inkubationsgefäßen (Ausnahme: Insulin-Antiserum im Medium) entnommen und eingefroren worden. Nach dem erneuten Auftauen werden diese Probengläschen mit 900 µl Pufferlösung folgender Zusammensetzung verdünnt:

Puffer:

$NaH_2PO_4 \times H_2O$	550,0	mg
Rinderserumalbumin	0,1	mg
Aqua dest.	ad 100	ml

pH-Wert: 7,35

Nach kräftigem Schütteln werden aus diesen Proben 100 µl entnommen und in zuvor durchnummerierte Plastikgläschen gegeben. Ebenso verfährt man mit der Verdünnungsreihe für die Eichkurve. Als "Leerwert" werden 100 µl Puffer vorgelegt.

Dann wird der lyophilisierte Antikörper nach Vorschrift gelöst und je 100 µl davon den Proben zugesetzt. Einpipettiert wird mit Hilfe eines Mikrodiluters. Die Proben werden geschüttelt, für sechs Stunden bei +4 °C kühl gestellt und danach mit [^{125}J]-Insulin versetzt. Der Vorgang entspricht der Antikörperzugabe. Nun läßt man die Substanzen erneut bei +4 °C stehen und miteinander reagieren. Nach 18 Stunden erfolgt ein erneuter Pufferzusatz, diesmal von 1 ml eisgekühlter Pufferlösung. Dann wird 20 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abgegossen, restliche anhängende Tropfen mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Proben in einem automatischen γ - Counter 1 Minute lang gezählt.

c) Auswertung

Die Insulinwerte der Proben werden aus einer Eichkurve abgelesen. Dazu werden die gemessenen Zerfälle pro Minute (cpm) auf der Ordinate, die Konzentration an Insulin in µE auf der Abszisse abgetragen.
Um eine Eichgerade zu erhalten, werden die Mittelwerte aus den Doppel- und Dreifachbestimmungen errechnet und der Quotient aus dem Mittelwert des "Leerwertes" und den Mittelwerten der Standards gebildet. Diese Quotienten werden gegen die Konzentration an Insulin in µE abgetragen, d.h. durch einen Olivetti Tischcomputer nach dem Prinzip der kleinsten Flächenquadrate eine Eichgerade erstellt.
Aus den Quotienten der Probewerte können nun mit Hilfe des Computers die Insulinwerte errechnet werden.

2.9.2.1 Messung der Insulinkonzentration im Inkubationsmedium in Gegenwart von Insulin-Antikörpern

a) Problematik und Prinzip

Die Insulinbestimmung wird wiederum nach der Doppelantikörper-Methode von Söldner u. Slone (39) durchgeführt.

Vor dieser Bestimmung ist jedoch der Insulin-Antikörper abzutrennen. Da seine Bindungsstellen nie alle besetzt sind bzw. die Bindung Insulin/Antikörper jederzeit wieder gelöst werden kann, besteht das Problem, daß dieser von uns den Proben zugesetzte Antikörper mit dem bei der Insulinbestimmung eingesetzten um die Bindung von Insulin konkurriert und damit die Meßwerte verfälscht.
Die Abtrennung geschieht - mit einigen Abänderungen - nach der Methode von Heding (40), wobei die Gesamtinsulinwerte (I_G) sowie die Werte an freiem, ungebundenem Insulin (I_F) ermittelt werden. Der Anteil des an den Antikörper gebundenen Insulins (I_B) errechnet sich wie folgt: $I_B = I_G - I_F$.

Die Abtrennung des Antikörpers von Insulin erfolgt durch Säurezusatz und anschließender Ausfällung des Antikörpers mit Äthanol 96 %. Freies Insulin wird bestimmt, nachdem der gesamte Antikörper-Insulinkomplex ausgefällt wurde. Zur Kontrolle werden bekannte Insulinkonzentrationen von 600 bzw. 1200 µE/ml in gleicher Weise wie die Proben behandelt, um die durch die Aufarbeitung entstehende Fehlerquote zu ermitteln. Sie beträgt durchschnittlich 10 %, wird aber bei jeder Versuchsreihe erneut bestimmt.

b) Durchführung

Je 5 Langerhanssche Inseln sind in 1 ml Inkubationsmedium 90 Minuten lang inkubiert worden. Davon werden 500 µl Überstand entnommen und in 5 ml Polyäthylengläschen gegeben. In Gruppe (1) wird der Gesamtgehalt an Insulin bestimmt, in Gruppe (2) der Anteil an freiem Insulin. Außerdem sind die unterschiedlichen Konzentrationen des zugesetzten Antikörpers zu beachten.
Die Insulinstandards (von 600 bzw. 1200 µE/ml + Antikörper in verschiedenen Konzentrationen) für die "recovery" Rate werden ebenfalls getrennt und entweder wie Gruppe (1) oder (2) behandelt. Hier wird eine dritte Gruppe (3) ohne Antikörperzusatz gebildet, bei der wie in Gruppe (1) der Gesamtinsulingehalt ermittelt wird.

Gesamtinsulinbestimmung = Gruppe (1)

Die 500 µl Inkubationsmedium werden mit 100 µl N HCl versetzt und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Daraufhin werden pro Probe 3 ml Äthanol 96 % zupipettiert und mit 90-95 µl N NaOH der pH-Wert auf 7,2-7,5 gebracht.
Eine Einstellung auf diesen pH-Bereich ist wichtig, da sich in Vorversuchen eine große Abhängigkeit der "recovery"-Rate vom pH-Wert herausgestellt hat.
Man schüttelt kräftig, wobei ein weißer, flockiger Niederschlag ausfällt, den man ca. 10 Minuten absetzen läßt und dann mit 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert, im Gefrierschrank vorgekühlt und dann gefriergetrocknet.

Bestimmung von freiem Insulin = Gruppe (2)

500 µl Inkubationsmedium werden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgt ein Zusatz von 2,5 ml Äthanol 96 %, wobei sofort ein weißer, flockiger Niederschlag entsteht. Es wird ebenfalls kräftig geschüttelt und sofort zentrifugiert. Die Proben werden analog Gruppe (1) weiterbehandelt.

Die solchermaßen aufgearbeiteten Proben der Gruppe (1) und (2) können nun zur üblichen Insulinbestimmung verwendet werden. Der gefriergetrocknete Rückstand löst sich vollständig in 1 ml der Pufferlösung. Je nach erwartetem Insulingehalt setzt man von dieser Lösung 10 oder 50 µl ein. Die Eichkurvenstandards sind analog diesen Volumina einzusetzen.
Die Eichkurve wird wiederum für Werte zwischen 0 und 20 µE Insulin erstellt, das entspricht 0 - 2000 µE Insulin/ml Inkubationsmedium.

2.9.2.2 Untersuchungen mit Exogenem Insulin

Das von außen zugesetzte Insulin wird in jedem Versuch den allgemeinen Inkubationsbedingungen unterworfen, indem man zu 1 ml Inkubationslösung die jeweils eingesetzte Insulinmenge pipettiert, aber ohne Inseln inkubiert. Dadurch werden die durch die Versuchsanordnung bzw. -durchführung bedingten Einflüsse berücksichtigt.
Der ermittelte Wert wird von den Werten der Insulinsekretion

der isolierten Langerhansschen Inseln nach Zugabe von Glucose, Stimulans und exogenem Insulin abgezogen. Die in den Tabellen und Abbildungen aufgeführten Werte entsprechen diesen "Netto"-Werten.
Die Insulinbestimmung erfolgt nach der eingangs erläuterten Methode.

2.10 Versuchsauswertung

Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte ± SEM dar, errechnet aus der in den Abbildungen oder Tabellen angegebenen Anzahl (n) von Versuchen.

Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der t-Test nach Student verwendet.

3. V E R S U C H S E R G E B N I S S E

3.1 PPS-Aktivität und Medium-Insulin

In den Tabellen 1-8 sind zum einen die Werte der Bestimmung der PPS Aktivität, zum anderen die Werte des unter den jeweiligen Versuchsbedingungen sezernierten Insulins aufgelistet.

Die Tabellen 1, 3, 5 und 7 beinhalten im einzelnen die Meßwerte der $^{14}CO_2$ Bestimmung aus $\left[1\text{-}^{14}C\right]$-und $\left[6\text{-}^{14}C\right]$ Glucose sowie der Glucoseutilisation. Außerdem wird der daraus errechnete Betrag des "specific yield" aufgeführt, schließlich als Ergebnis der Prozentsatz des Pentosephosphatshunts (PPS) bzw. die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS. Sie errechnet sich aus den % PPS und der Glucoseutilisation. Die beiden Endergebnisse sind - zur besseren Übersicht - in den Schaubildern nochmals herausgehoben worden. Dabei gibt je die linke Säule eines Säulenpaares den Prozentsatz PPS an, die rechte, schraffierte Säule die absolute Rate. Die in den Schaubildern angegebene Versuchszahl versteht sich als Anzahl der Versuchsreihen. Die in den Tabellen angegebene Anzahl (n) zu den verschiedenen Parametern ist die Anzahl der Einzelwerte.

In den Tabellen 2, 4, 6, und 8 sind die den jeweiligen Versuchsbedingungen zugehörigen Insulinwerte aufgeführt, bzw. in den entsprechenden Abbildungen aufgezeigt.

Alle Tabellen sind im Anhang zusammengefaßt.

Unter folgenden Bedingungen sind die oben genannten Größen bestimmt worden.

3.1.1 Dosis - Wirkungsbeziehungen in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen

3.1.1.1

Wenn 15 Inseln in 0,15 ml Medium 180 Minuten lang unter Zusatz von 5,6; 11,1 oder 16,7 mmol/l Glucose inkubiert werden, so steigt die $^{14}CO_2$ Bildung aus [1-^{14}C]- und aus [6-^{14}C] Glucose sowie die Bildung von THO aus [5-^{3}H]Glucose dosisabhängig an (Tabelle 1; Abbildung 4).

Gegenüber den Ausgangswerten (Glucose 5,6 mM) ist in Gegenwart von 11,1 mmol/l Glucose eine Steigerung bei allen drei genannten Meßgrößen um das drei - bis vierfache, in Gegenwart von 16,7 mmol/l Glucose um das sechs - bis neunfache zu sehen.

Die Berechnung der absoluten Rate der Glucoseoxidation im PPS dagegen ergibt keinen signifikanten Anstieg (von 15,8 auf 17,1 bzw. 21,5 pmol/180 min/10 Inseln), die des Prozentsatzes des PPS sogar eine geringe Abnahme (von 2,1 auf 0,6 bzw. 0,5 %).

Die gewählte Versuchsanordnung läßt eine hohe Akkumulation von Insulin im Medium zu und zwar steigt die Insulinkonzentration berechnet auf 1 ml in Abhängigkeit von der

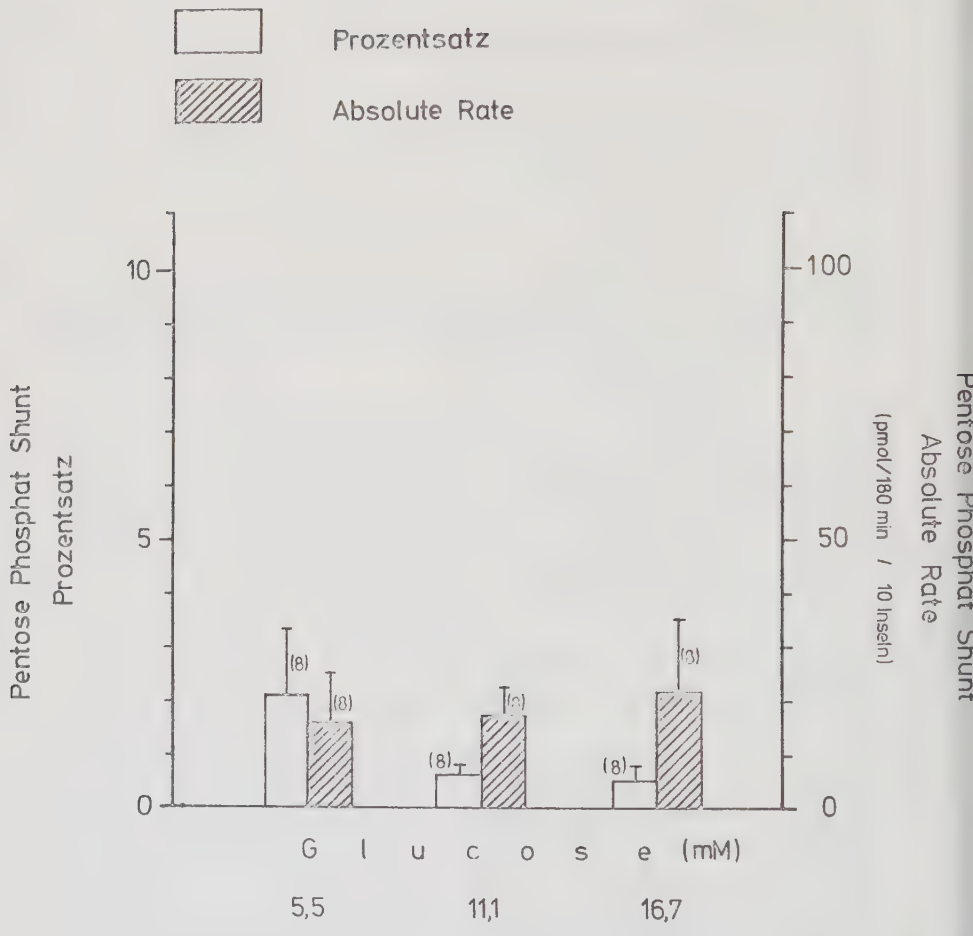


Abb.4: Einfluß von Glucose auf die PPS Aktivität in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 10 Inseln in 0,15 ml während 180 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 oder 16,7 mmol/l Glucose.
Mittelwerte $\pm$ SEM
Anzahl der Versuche in Klammern

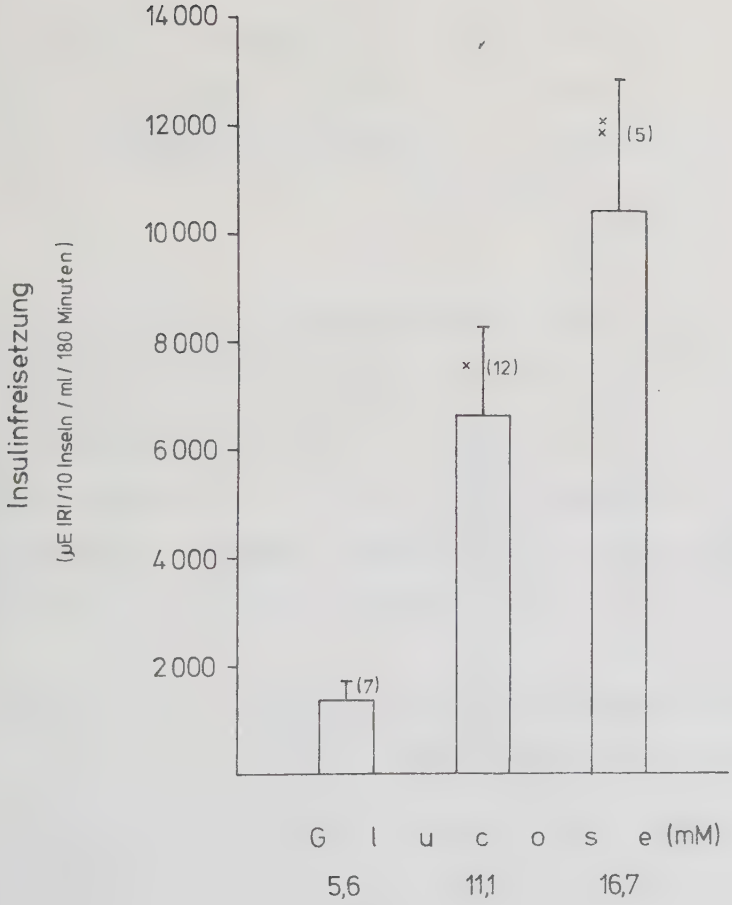


Abb.5: Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 10 Inseln in 0,15 ml während 180 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 oder 16,7 mmol/l Glucose.
Mittelwerte $\pm$ SEM
Anzahl der Versuche in Klammern
x = P < 0,05; xx = P < 0,001 vs 5,6 mmol/l Glucose

Glucosekonzentration von 1 385 auf 6 632 bzw. 10 431 µE/ml an, wie in Abbildung 5 zu sehen ist.
Die Insulinsekretion pro Insel beträgt 20,8; 99,5 bzw. 156,5 µE. Vergleicht man die Werte in Gegenwart von 5,6 mmol/l Glucose mit denen von 16,7 mmol/l, so errechnet sich ein Anstieg um das siebenfache.

3.1.1.2

Um die oben aufgezeigte Anreicherung von Insulin im Medium zu vermindern, wurden die Inkubationsbedingungen geändert, d.h. die Anzahl der Langerhansschen Inseln wurde auf 5 gesenkt, die Inkubationszeit auf 90 Minuten verkürzt und das Inkubationsvolumen auf 1 ml erhöht. Es war zu untersuchen, ob die geänderten Inkubationsbedingungen zu einer Änderung der PPS Aktivität in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration führen.

Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 6 und 7 bzw. in Tabelle 3 und 4 aufgeführt.

Wurde die Glucosekonzentration im Medium von 5,6 mmol/l auf 16,7 mmol/l erhöht, so war die Steigerung der Glucoseoxidation von $[1\text{-}^{14}C]$Glucose (von 52,1 auf 199,7 pmol/90 min/5 Inseln) und von $[6\text{-}^{14}C]$ Glucose (von 37,9 auf 76;3 pmol/90 min/ 5 Inseln) signifikant. Sie ist jedoch geringer als die der in Tabelle 1 aufgeführten Werte, d.h. sie beträgt bei $[6\text{-}^{14}C]$Glucose nur das zweifache, bei $[1\text{-}^{14}C]$ Glucose das vierfache verglichen mit den Ausgangswerten.
Auch bei der absoluten Rate der Glucoseoxidation errechnet sich eine signifikante Zunahme gegenüber den Basiswerten

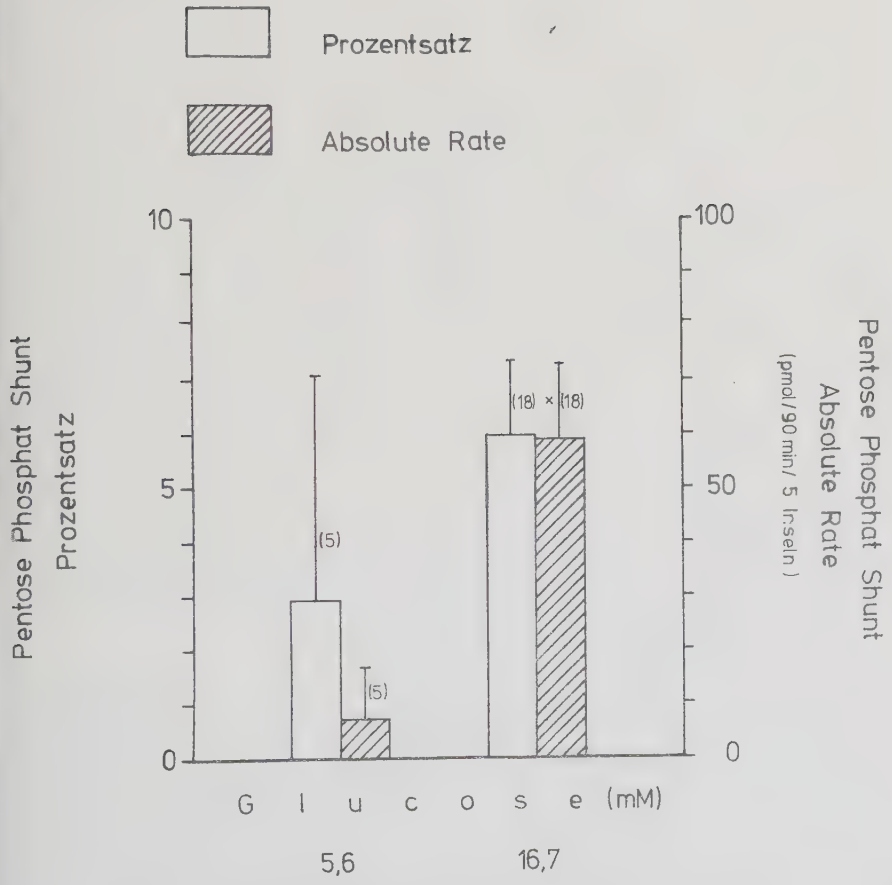


Abb.6: Einfluß von Glucose auf die PPS Aktivität in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6 oder 16,7 mmol/l Glucose.
Mittelwerte $\pm$ SEM
Anzahl der Versuche in Klammern
x = P < 0,01 vs 5,6 mmol/l Glucose

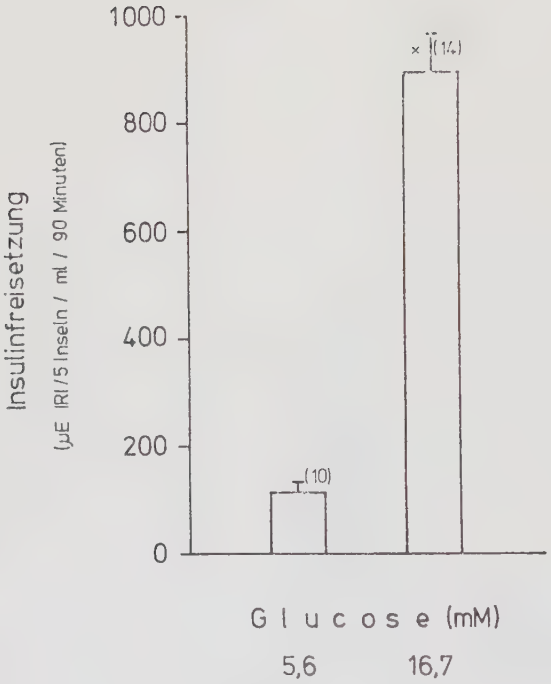


Abb.7: Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6 oder 16,7 mmol/l Glucose.
Mittelwerte $\pm$ SEM
Anzahl der Versuche in Klammern
x = $P < 0{,}001$ vs 5,6 mmol/l Glucose

von 5,6 mmol/l Glucose (Anstieg von 7,3 auf 59,0 pmol/90 min/ 5 Inseln).
Daß unter den veränderten Versuchsbedingungen der prozentuale Anteil des PPS an der Glucoseoxidation erhöht werden konnte, zeigt ein Vergleich mit den Werten aus Tabelle 1. Bei beiden Versuchsreihen wurde in Gegenwart von 5,6 mmol/l Glucose ein Prozentsatz PPS von 2-3 % ermittelt, der jedoch in Gegenwart von 16,7 mmol/l Glucose auf 0,5 % (Abb. 4) zurückging bzw. auf 5,98 % anstieg ($P < 0,001$) (Abb. 6).

Die Insulinkonzentration stieg von 111,4 µE/ml bei 5,6 mM Glucosekonzentration auf 891,6 µE IRI/ml in Gegenwart von 16,7 mmol/l Glucose an. Der Anstieg ist signifikant. Die Insulinsekretion pro Insel ist folglich von 22,3 auf 178,3 µE gesteigert, ein Anstieg um das achtfache.

3.1.1.3
Verglichen mit anderen Befunden aus diesem Labor, die bei Zusatz von 400 µE/ml exogenem Insulin zum Inkubationsmedium bereits eine Hemmung der PPS Aktivität und der Insulinsekretion zeigen, liegt der Gehalt von 891 µE IRI/ml bei einer Glucosekonzentration von 16,7 mmol/l sehr hoch.
So sind die Versuchsbedingungen, 5 Inseln in 1 ml Medium über 90 Minuten zu inkubieren, wohl ebenfalls in unserer dritten Versuchsreihe gewählt worden, jedoch mit dem Zusatz von Insulin-Antiserum (GPAIS = guinea pig anti-insulin serum). Er dient dazu,einen möglichst großen Teil des sezernierten Insulins (800 µE IRI/ml) abzufangen und damit eine Akkumulation endgültig auszuschließen.

Sowohl bei der $^{14}CO_2$ Bildung aus $[1-^{14}C]$- als auch aus $[6-^{14}C]$Glucose ist ein dosisabhängiger Anstieg zu beobachten (Tabelle 5), bei $[1-^{14}C]$ Glucose von 105,1 auf 166,0 bzw. 258,8 pmol/90 min/5 Inseln, bei $[6-^{14}C]$ Glucose von 49,9 auf 62,3 bzw. 76,9 pmol/90 min/5 Inseln.
Auch die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS steigt glucoseabhängig an, und zwar von 17,7 auf 42,6 bzw. 123,4 pmol/90 min/5 Inseln (Tabelle 5; Abbildung 8).
Der Prozentsatz des PPS liegt in Gegenwart von 5,6 mmol/l Glucose wie in Tabelle 1 und 3 wiederum bei ca. 2 %, steigt aber dosisabhängig an und beträgt in Gegenwart von 16,7 mmol/l Glucose 9,4 %. Er unterscheidet sich damit signifikant vom Ausgangswert.

Die entsprechenden Insulinwerte sind in Tabelle 6 bzw. Abbildung 9 aufgeführt. Während in Gegenwart von GPAIS das Gesamtinsulin (freies + gebundenes Insulin) dosisabhängig von der Glucosekonzentration ansteigt (von 75,3 auf 374,4 bzw. 1 227,8 µE/ml), erhöht sich der Anteil des freien Insulins nur geringfügig (von 32,9 auf 46,8 bzw. 81,6 µE/ml).

Der Anstieg der Insulinsekretion bei GPAIS-Zusatz umgerechnet auf eine Insel beträgt in Gegenwart von 5,6 mmol/l Glucose 15,1 µE, in Gegenwart von 16,7 mmol/l Glucose 245,6 µE. Das entspricht einem Anstieg um das sechzehnfache.
In Tabelle 6 wird weiterhin aufgezeigt, daß der Betrag an Gesamtinsulin, der bei Zugabe von 16,7 mmol/l Glucose sezerniert wird, in Gegenwart von GPAIS signifikant höher liegt ($P < 0,05$) als ohne GPAIS (1 227,8 im Vergleich zu 891,6 µE/ml).

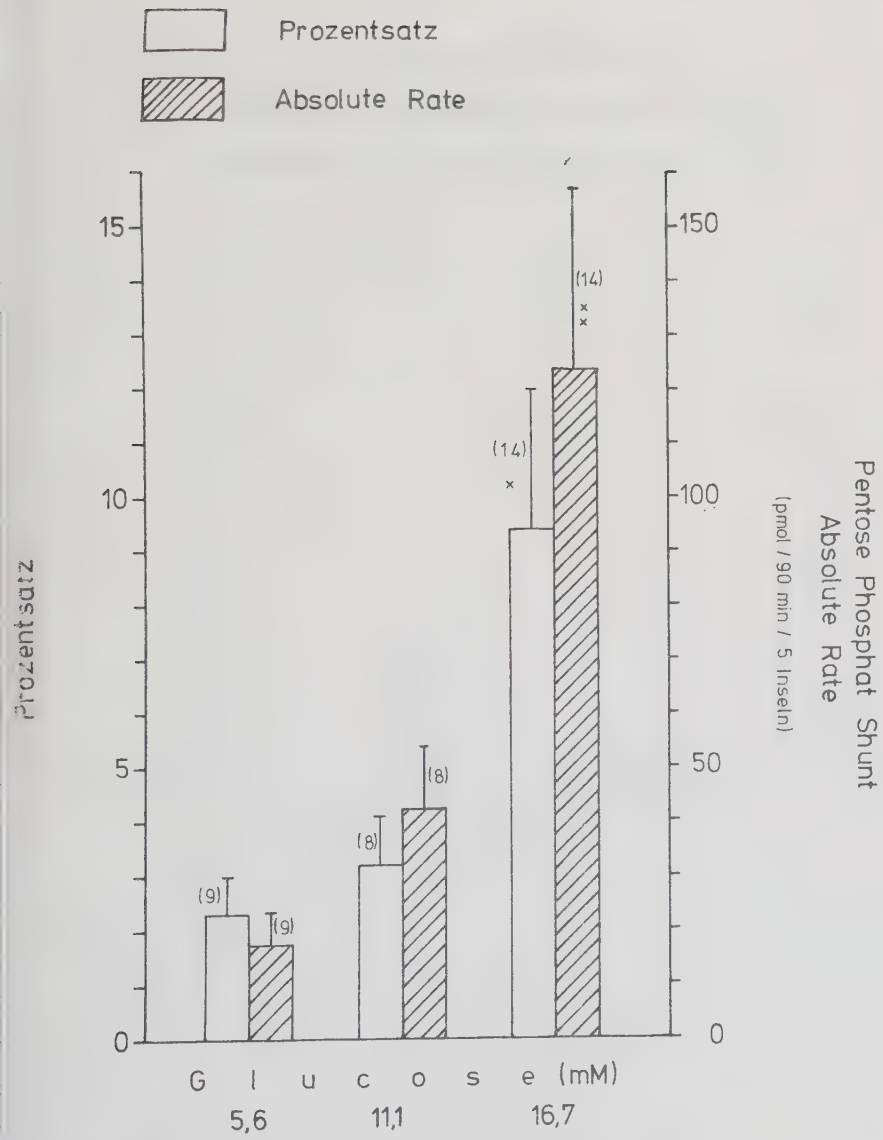


Abb.8: Einfluß von Glucose auf die PPS Aktivität in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 oder 16,7 mmol/l Glucose und von GPAIS, um 800 µE IRI zu binden. Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern
x = P < 0,05; xx = P < 0,001 vs 5,6 u./od. 11,1 mmol/l Glucose

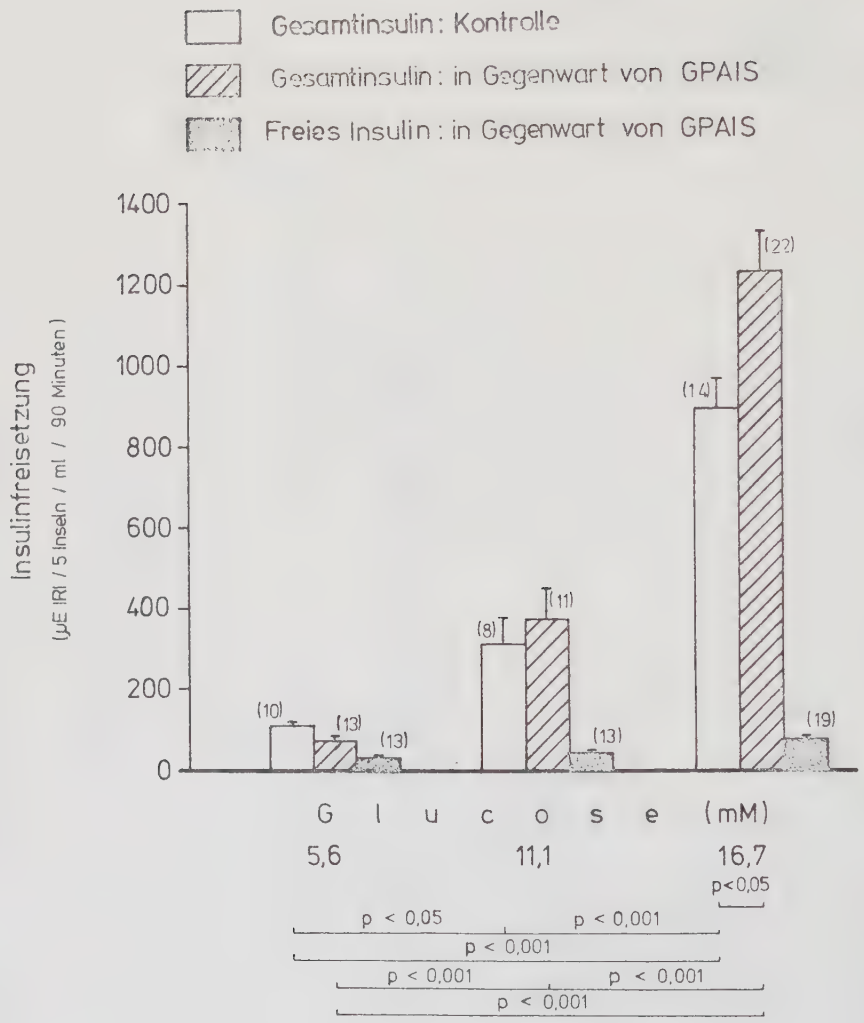


Abb.9: Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 oder 16,7 mmol/l Glucose und von GPAIS, um 800 µE IRI zu binden. Den Kontrollwerten wurde Normalserum zugesetzt.
Mittelwerte $\pm$ SEM
Anzahl der Versuche in Klammern

3.1.2 Abhängigkeit der PPS Aktivität und der Insulinsekretion von unterschiedlichen Konzentrationen an GPAIS (guinea pig anti-insulin serum)

Die in den vorherigen Versuchen beschriebenen Inkubationsbedingungen wurden beibehalten und 5 isolierte Langerhanssche Inseln in 1 ml Medium unter Zusatz von 16,7 mmol/l Glucose 90 Minuten lang inkubiert.
Der Kontrollgruppe ist außerdem "Normalserum" eines Meerschweinchens zugesetzt worden, die beiden anderen Gruppen erhielten Insulin-Antiserum in einer Konzentration, um zum einen 400 µE Insulin, zum anderen 800 µE binden zu können. Eine beträchtliche, von der Menge des zugesetzten Antikörpers abhängige Steigerung des PPS Prozentsatzes sowie seiner absoluten Rate kann gezeigt werden. Der Prozentsatz des PPS steigt von 5,98 auf 9,50 bzw. 16,33 % an, die absolute Rate der Glucoseoxidation im PPS von 59,0 auf 84,8 bzw. 126,9 pmol/90 min/5 Inseln (Tabelle 7; Abbildung 10).
Der prozentuale Anteil des PPS an der Glucoseoxidation ist somit gegenüber dem Kontrollserum um das zwei - bzw. dreifache erhöht, die absolute Rate um etwa das anderthalb- bzw. zweifache.

Die Werte dieser Tabelle in Bezug auf 16,7 mmol/l Glucose und Antikörperzusatz, um 800 µE IRI zu binden, sind nicht mit denen in Tabelle 5 vergleichbar, da die beiden Versuchsreihen unabhängig voneinander durchgeführt worden sind.

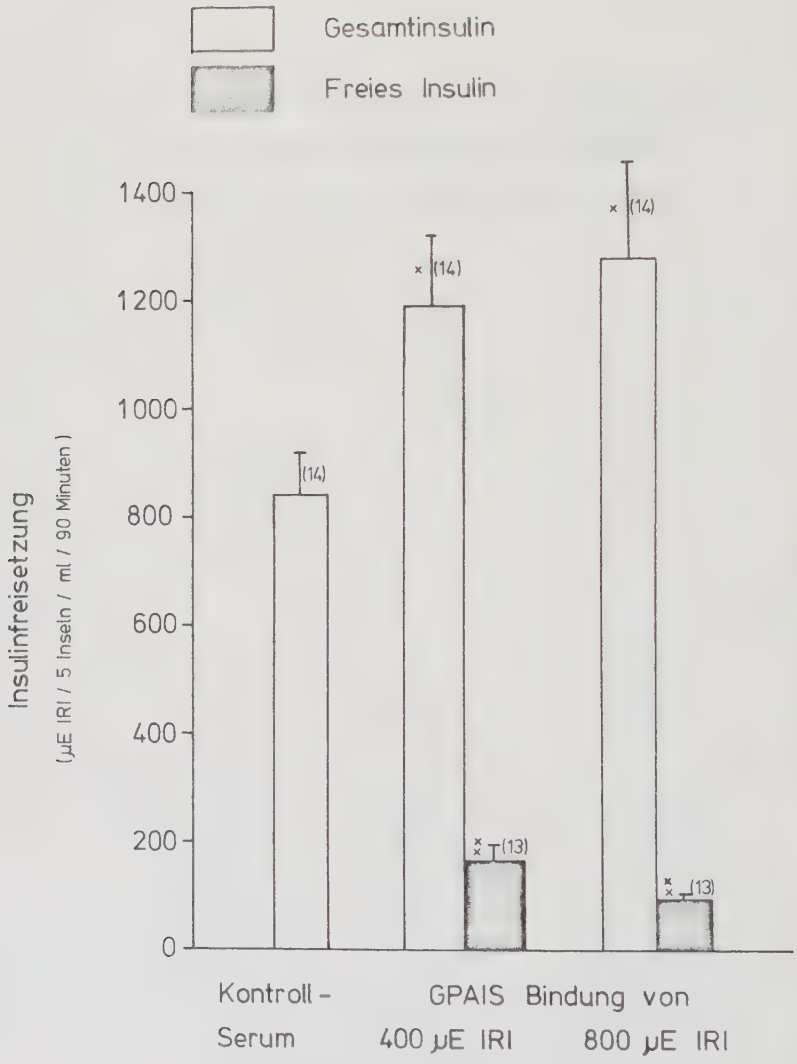


Abb.11: Einfluß von GPAIS (guinea pig anti-insulin serum) auf Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Insel der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten unter Zusatz von 16,7 mmol/l Glucose, von Normalserum zu den Kontrollwerten und von GPAIS, um 4 bzw. 800 µE IRI zu binden.
Mittelwerte ± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern
x = P < 0,05; xx = P < 0,001 vs Kontrolle

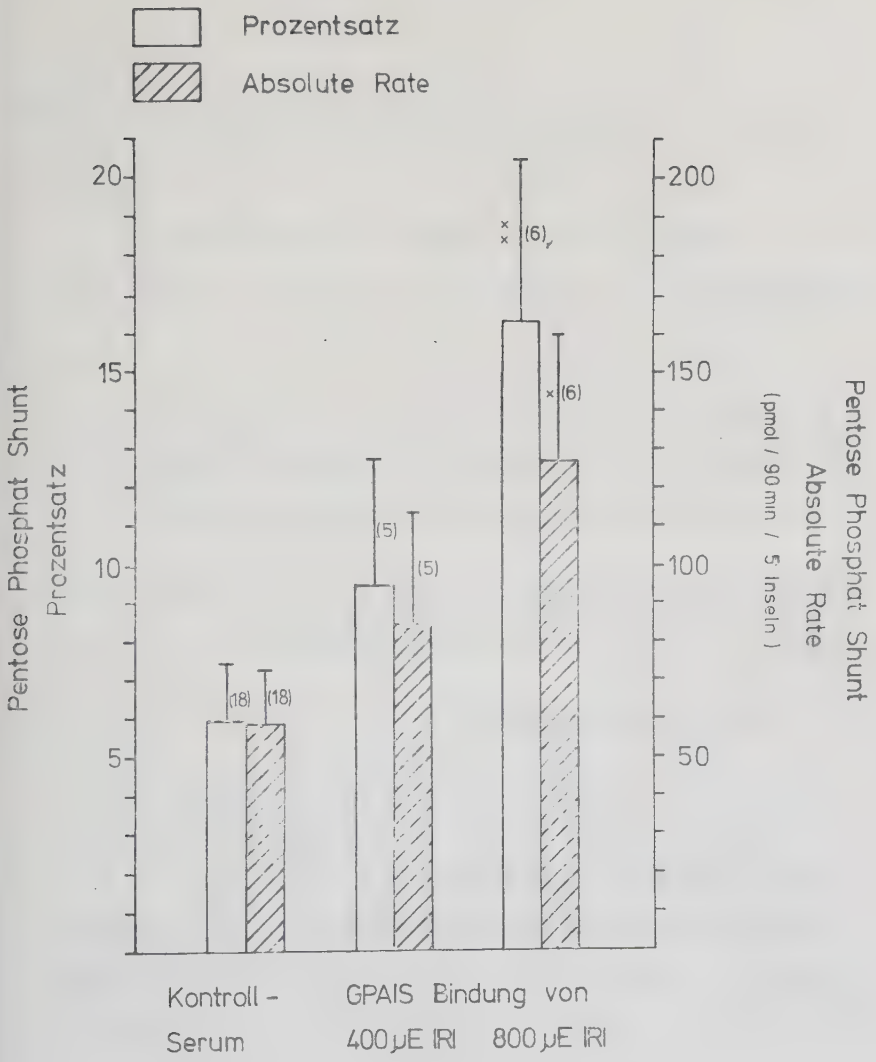


Abb.10: Einfluß von GPAIS (guinea pig anti-insulin serum) auf die PPS Aktivität in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten unter Zusatz von 16,7 mmol/l Glucose, von Normalserum zu den Kontrollwerten und von GPAIS, um 400 bzw. 800 µE IRI zu binden.
Mittelwerte $\pm$ SEM
Anzahl der Versuche in Klammern
x = $P < 0,05$; xx = $P < 0,01$ vs Kontrolle

Auch in Tab.8 und Abb.11 ist ein signifikanter, dosisabhängiger Anstieg der Insulingesamtsekretion auf 1 189 bzw. 1 271 µE/ml bei Antikörperzusatz gegenüber dem Kontrollwert von 840 µE IRI/ml zu sehen. Der freie, nicht an den Antikörper gebundene Anteil geht dagegen auf 163 bzw. 91 µE IRI/ml zurück.

3.2 Einfluß von exogenem Insulin auf die durch p-Chlormercuribenzoat, Aminophyllin, Tolbutamid, Arginin, Leucin und Glucose induzierte Insulinsekretion

Die genauen Untersuchungsergebnisse sind in Tabellen aufgeführt und gesondert im Anhang zusammengefaßt.

3.2.1 p-Chlormercuribenzoat

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen mit p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) war die für die Versuche geeignetste p-CMB - sowie Glucosekonzentration zu ermitteln.
Zu diesem Zweck wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen aufgestellt mit p-CMB - Zusätzen von 0 bis 1,0 mmol/l und Glucosekonzentrationen von 5,6; 11,1 und 16,7 mmol/l. Gemessen wurde das aus 5 isolierten Langerhansschen Inseln in 1 ml Inkubationsmedium freigesetzte Insulin. Die Inkubationszeit wurde gegenüber den sonst in diesem Labor üblichen Bedingungen auf 30 Minuten herabgesetzt, da während 90-minütiger Inkubation zum Teil extrem hohe Insulinwerte gemessen worden waren (>2 000 µE/ml). In dieser Zeit könnte p-CMB die Zellmembran bereits geschädigt haben und in die Zelle eingedrungen sein.

Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungsbestimmung sind in Tabelle 9 aufgeführt bzw. in Abbildung 12 nochmals veranschaulicht.

Für alle drei Glucosekonzentrationen ergibt sich ein ähnliches Bild. Erst eine p-CMB Konzentration von 0,3 mmol/l führt zu einer geringen, nicht signifikanten Stimulation der Insulinsekretion, die jedoch bei weiterer Erhöhung des p-CMB Zusatzes (0,5 und 1,0 mM) beträchtlich zunimmt. Die Werte des sezernierten Insulins liegen bei allen p-CMB Konzentrationen um ca. 150 µE höher gegenüber der Glucosezugabe von 5,6 mmol/l, wenn 11,1 mmol/l Glucose vorhanden sind bzw. um ca. 200 µE, wenn die Glucosekonzentration von 11,1 auf 16,7 mmol/l erhöht worden ist; d.h. in jedem Fall steigert der p-CMB Zusatz die Insulinsekretion gegenüber Glucose allein sowie gegenüber der niedrigeren Glucose - plus der gleichen p-CMB Konzentration. Obwohl nicht alle Ergebnisse signifikant voneinander unterschieden sind (Tabelle 9), kann diese Aussage gemacht werden. Mit dem Einsatz höherer p-CMB Konzentrationen (0,5 und 1,0 mM) nehmen die Streuungen der Meßwerte zu und darin ist wohl die Begründung zu suchen, warum sich keine Signifikanz beim Vergleich dieser Werte untereinander errechnen läßt.

Da in Gegenwart substimulatorischer Konzentrationen von Glucose (5,6 mM) mit 0,5 mmol/l p-CMB bereits eine signifikante Steigerung der Insulinsekretion von 73 auf 321 µE/ml erzielt werden konnte und in diesem Konzentrationsbereich die Streuungen der ermittelten Werte noch in akzeptablen

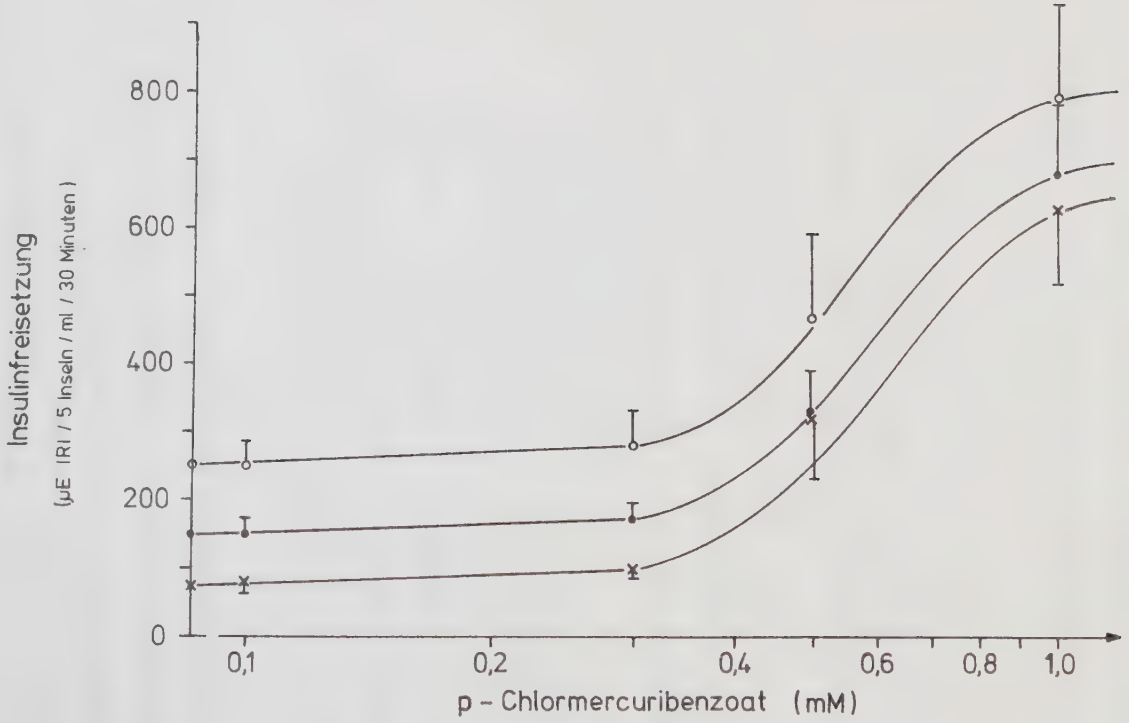


Abb. 12: Einfluß verschiedener Konzentrationen von Glucose (5,6;11,1 oder 16,7 mM) und von p-CMB (0,1; 0,3; 0,5 oder 1,0 mM) auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte.

x = 5,6 mmol/l Glucose ● = 11,1 mmol/l Glucose o = 16,7 mmol/l Glucose

Grenzen liegen, werden für den Einsatz bei den weiteren Versuchen diese beiden Konzentrationen ausgewählt.

In Abbildung 13 ist der in vitro Effekt von exogenem Insulin auf die durch p-CMB induzierte Insulinsekretion Langerhansscher Inseln zu sehen. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 10 aufgelistet. Wird dem Inkubationsmedium, das Glucose in substimulatorischer Konzentration von 5,6 mmol/l enthält, p-CMB (0,5 mM) zugegeben, so kann die Insulinfreisetzung der Inseln signifikant um das vierfache auf 420 µE/ml gesteigert werden.
Eine Hemmung dieser durch p-CMB induzierten Insulinsekretion wird durch Zugabe von exogenem Insulin in Konzentrationen von 100 - 800 µE/ml erzielt und zwar von 420 auf 229 bzw. 176 bzw. 137 bzw. 217 µE IRI/ml, wobei schon die Hemmung mit 100 µE IRI/ml signifikant ist.

Die angegebenen Werte verstehen sich hier sowie in den folgenden Untersuchungen als Netto-Werte, d.h. der Zusatz von exogenem Insulin (= Meßwerte nach Inkubation von exogenem Insulin ohne Inseln), ist bereits abgezogen worden. Die zu subtrahierenden Beträge sind für jede Versuchsreihe neu ermittelt worden.

3.2.2 Aminophyllin

Hier wurde eine Glucosekonzentration von 11,1 mmol/l gewählt. Durch den Zusatz von Aminophyllin (10 mM) wird die

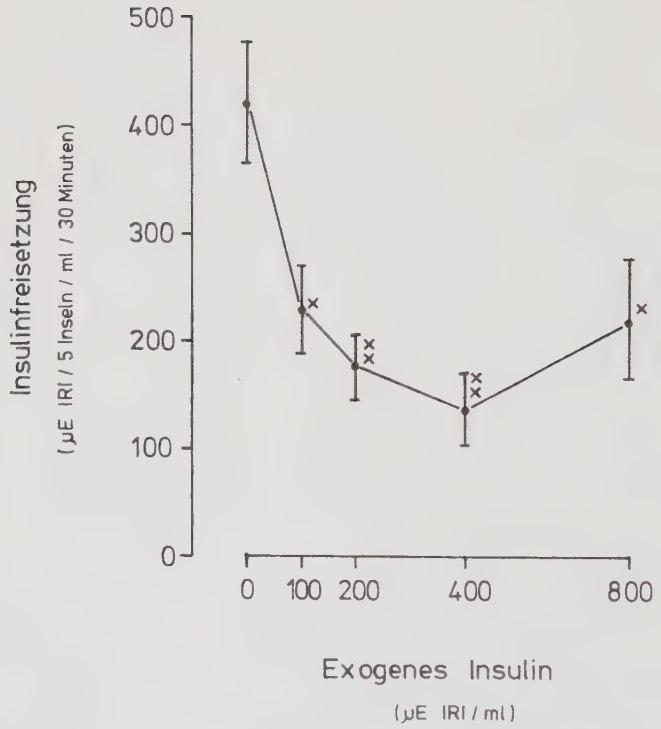


Abb.13: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch p-Chlormercuribenzoat (0,5 mM) induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose (5,6 mM).
5 Inseln wurden in 1 ml 30 Minuten lang inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM
x = P < 0,05; xx = P < 0,001 vs 0 µE exogenes Insulin
Insulinsekretion (µE IRI/ml) durch Glucose alleine:
102 $\pm$ 25

Insulinsekretion der Inseln signifikant von 423 auf 686 µE/ml erhöht (Tabelle 11 und Abbildung 14).
Exogenes Insulin übt, wie in Abbildung 14 zu sehen ist, eine Hemmwirkung auf die durch Glucose und Aminophyllin induzierte Insulinfreisetzung aus. Die Wirkung ist dosisabhängig (Senkung von 686 auf 619 bzw. 586 bzw. 546 bzw. 495 µE IRI/ml) und ab einer Konzentration von 200 µE exogenem Insulin/ml signifikant von dem Wert der durch Glucose und Aminophyllin hervorgerufenen Insulinsekretion verschieden.

3.2.3 Tolbutamid

Die Untersuchungsergebnisse mit Tolbutamid sind in Tabelle 12 und Abbildung 15 zusammengefaßt.
Tolbutamid wird in einer Konzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt, die Glucose daneben in einer Konzentration von 11,1mmol/l.
Tolbutamid erhöht die durch Glucose induzierte Insulinsekretion signifikant von 467 auf 705 µE IRI/ml.
Diese Steigerung kann durch den Zusatz von exogenem Insulin signifikant gehemmt werden und führt bei Zugabe von 800 µE/ml auf eine Insulinkonzentration von 486 µE/ml zurück.
Wird der Zusatz von exogenem Insulin von 100 auf 200 µE/ml erhöht, so bleibt die gemessene Insulinmenge im Medium unverändert (595 bzw. 596 µE IRI/ml) und sinkt erst bei der Zugabe der doppelten Menge an exogenem Insulin weiter ab auf 557 µE/ml.

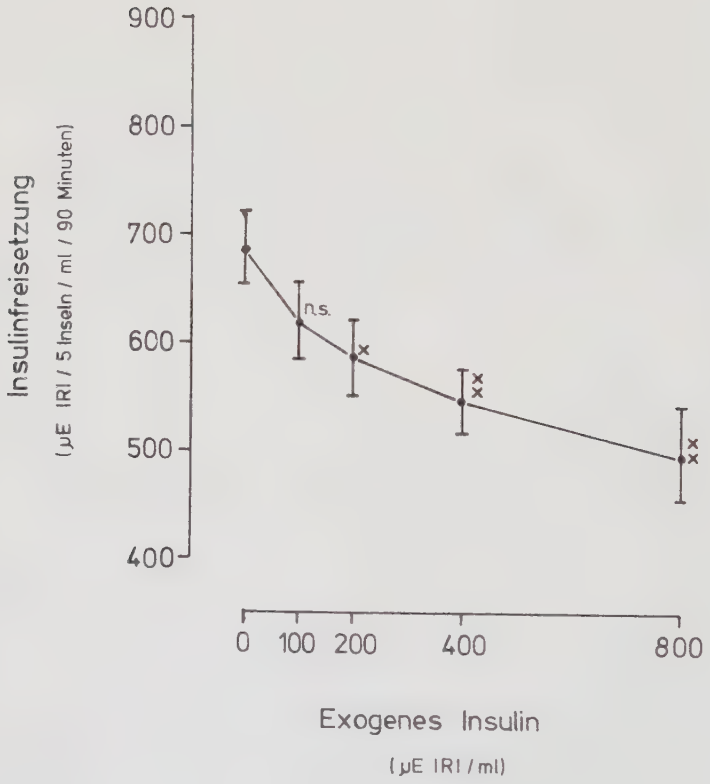


Abb. 14: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Glucose (11,1 mM) und Aminophyllin (10 mM) induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte.
5 Inseln wurden in 1 ml 90 Minuten lang inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM
x = $P < 0,05$; xx = $P < 0,01$ vs 0 µE exogenes Insulin
Insulinsekretion (µE IRI/ml) durch Glucose alleine:
423 ± 22

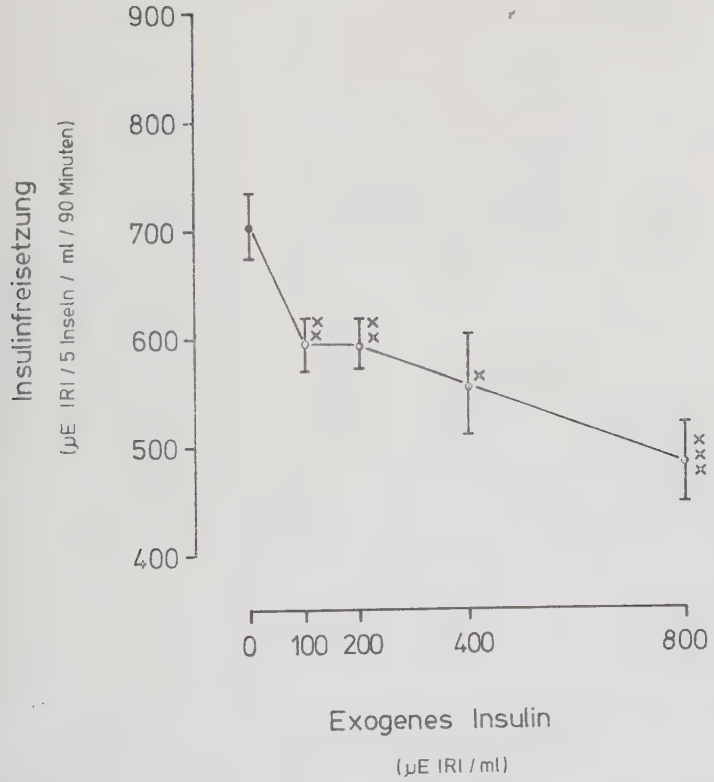


Abb. 15: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Glucose (11,1 m
und Tolbutamid (0,1 mg/ml) induzierte Insulinsekretion
von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte.
5 Inseln wurden in 1 ml 90 Minuten lang inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM
x = P < 0,05; xx = P < 0,01; xxx = P < 0,001
vs 0 µE exogenes Insulin
Insulinsekretion (µE IRI/ ml) durch Glucose alleine:
467 $\pm$ 29

3.2.4 Arginin•HCl

Mit Arginin wird in diesen Untersuchungen neben Leucin eine Aminosäure getestet. Sie erhöht die durch Glucose (11,1 mM) induzierte Insulinsekretion und wird bei unseren Versuchen in einer Konzentration von 10 mmol/l zugegeben. Tabelle 13 und Abbildung 16 zeigen einerseits eine ca. um das doppelte gesteigerte Insulinfreisetzung von 457 auf 852 µE/ml, wenn neben 11,1 mmol/l Glucose Arginin•HCl (10 mM) im Inkubationsmedium gelöst ist.
Andererseits wird diese gesteigerte Insulinsekretion durch exogenes Insulin in Konzentrationen zwischen 100 und 800 µE/ml dosisabhängig gehemmt von 852 auf 817 bzw. 771 bzw. 660 bzw. 465 µE/ml. Die Hemmung verläuft linear, wenn die Menge an exogenem Insulin von 100 auf 200 bzw. 400 bzw. auf 800 µE/ml jeweils verdoppelt wird und ist signifikant bei Zusatz von 400 und 800 µE/ml.

3.2.5 Leucin

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 14 bzw. Abbildung 17 aufgeführt. Leucin wird in einer Konzentration von 10 mmol/l eingesetzt und steigert die durch substimulatorische Mengen Glucose (5,6 mM) hervorgerufene Insulinsekretion signifikant um das vierfache von 89 auf 374 µE/ml. Exogenes Insulin kommt wiederum in Konzentrationen von 100, 200, 400 und 800 µE/ml zur Anwendung und bewirkt schon nach dem Zusatz von 200 µE eine signifikante Hemmung der Insulinsekretion (277 µE IRI/ml). Die Insulinwerte sinken bei

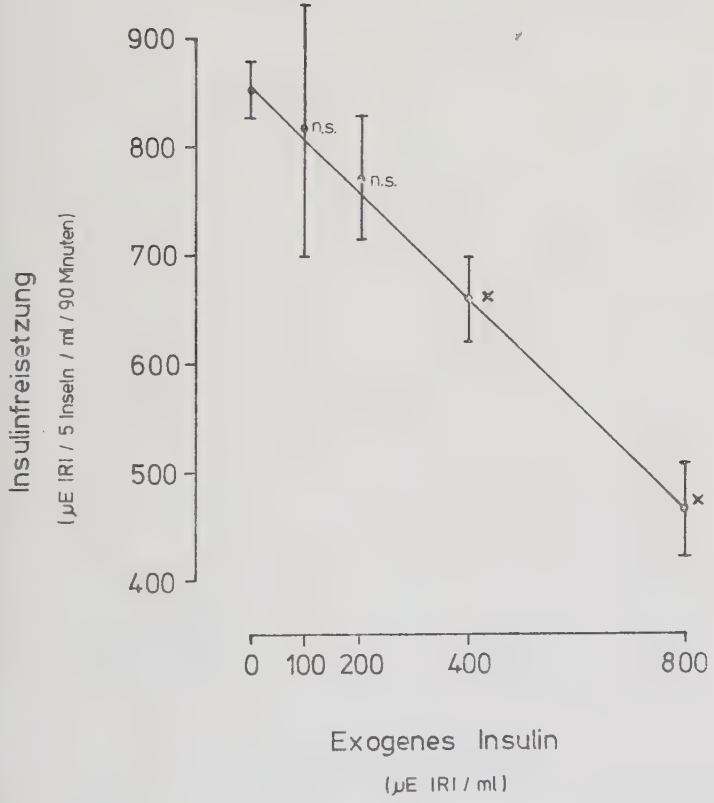


Abb. 16: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Glucose (11,1 mM) und Arginin•HCl (10 mM) induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte.
5 Inseln wurden in 1 ml 90 Minuten lang inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM
x = P < 0,001 vs 0 µE exogenes Insulin
Insulinsekretion (µE IRI/ml) durch Glucose alleine:
457 $\pm$ 25

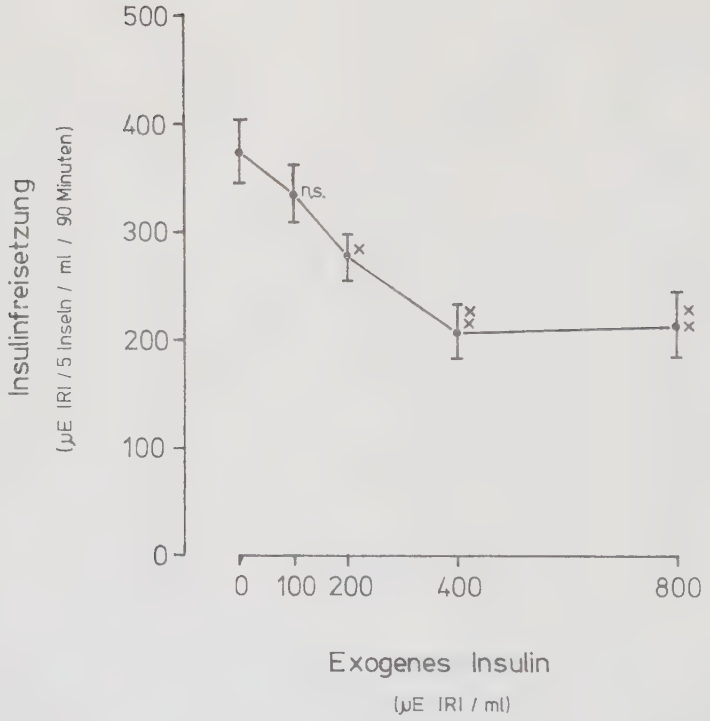


Abb. 17: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Leucin (10 mM) induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose (5,6 mM). 5 Inseln wurden in 1 ml 90 Minuten lang inkubiert. Mittelwerte $\pm$ SEM

x = $P < 0,05$; xx = $P < 0,001$ vs 0 µE exogenes Insulin

Insulinsekretion (µE IRI/ml) durch Glucose alleine: 89 ± 18

Zugabe von 400 µE exogenem Insulin auf ca. 200 µE ab und bleiben auf diesem Niveau auch bei Zusatz höherer exogener Insulinkonzentrationen (800 µE).

3.2.6 Glucose (11,1 mM)

Die in Tabelle 15 und Abbildung 18 aufgeführten Versuche dienen zum Vergleich mit denjenigen Versuchsreihen, bei denen Glucose in einer Konzentration von 11,1 mmol/l eingesetzt worden ist.
Hier wurde nur die Glucose (11,1 mM) verwendet und der Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Glucose alleine induzierte Insulinsekretion getestet. Die übrigen Versuchsbedingungen wurden beibehalten.
Durch den Zusatz von exogenem Insulin ist wohl eine geringe Abnahme der Insulinfreisetzung zu beobachten (bei Zugabe von 800 µE/ml um ca. 50 µE), diese Hemmwirkung ist jedoch nicht signifikant.

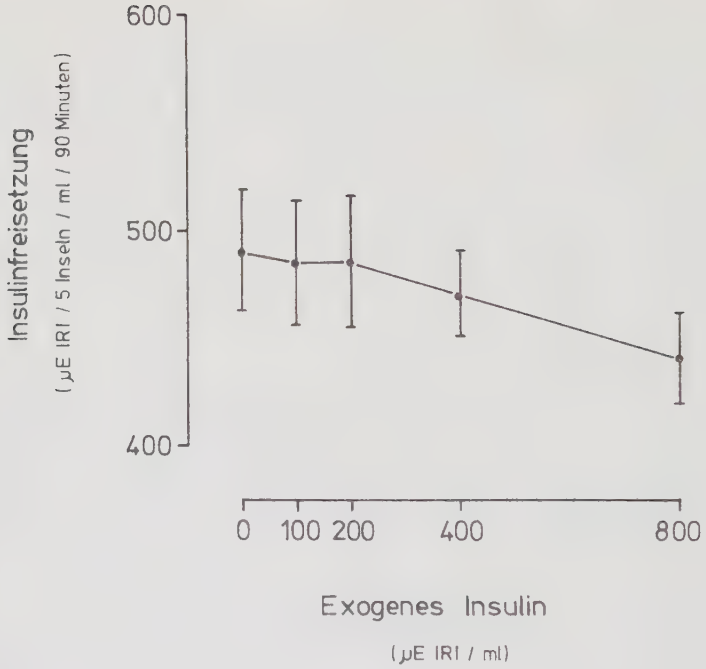


Abb. 18: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Glucose (11,1 mM) induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte.
5 Inseln wurden in 1 ml 90 Minuten lang inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM

4. DISKUSSION

4.1 Abhängigkeit der Aktivität des PPS von der Glucose - und der Insulinkonzentration im Medium

Über die Bedeutung des Pentosephosphatshunts (PPS) bei der Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln herrschen noch immer kontroverse Meinungen.

Seine wichtige Rolle in anderen Gewebearten und anderen endokrinen Organen ist dagegen bereits allgemein anerkannt, so z.B. in der Nebennierenrinde (12) und in der Schilddrüse (10,11). Im Lungengewebe beträgt sein Anteil an der Glucoseutilisation 11-12 % (41), im Milchdrüsengewebe 20-30 % (42) und in den Erythrocyten sogar 30-40 % (43).

Die Angaben über die Beteiligung des PPS an der Glucoseoxidation in Langerhansschen Inseln sind recht verschieden und reichen von 3-12,6 %.

Außerdem finden manche Autoren, daß mit steigenden Glucosekonzentrationen im Medium dieser Anteil des PPS auf 3-0,3 % zurücksinkt, während gleichzeitig die Insulinsekretion zunimmt (13,14,16). An Hand dieser Ergebnisse argumentieren sie, daß der Glucoseabbau über den PPS für die Insulinsekretion wohl unbedeutend sei und daß, da die Sekretion von Insulin von der Glucosekonzentration abhängig ist, nur solche Stoffwechselwege der Glucose eine Bedeutung für den Mechanismus der Insulinsekretion haben können, deren Ausmaß ebenfalls von der Glucosekonzentration abhängt.

Ganz im Gegensatz zu dieser Meinung stehen Befunde, u.a. aus diesem Labor und von anderen Arbeitsgruppen, die bereits in der Einleitung diskutiert wurden.
Darüberhinaus hat sich gezeigt, daß die Konzentration von 6-PG bzw. NADPH, das zum großen Teil aus dem PPS stammt, von der Glucosekonzentration abhängig ist (21,44). Eine experimentelle Senkung des insulären NADPH, z.B. durch Methylenblau führte zu einer Hemmung der Glucose induzierten Insulinsekretion (45). Auch konnte gezeigt werden, daß durch Zusatz von exogenem Insulin der 6-PG/G-6-P Quotient (21) sowie die Aktivität des PPS (30), der NADPH/NADP - Quotient (30) und die Insulinsekretion abnahmen.
Die hier aufgeführten Ergebnisse weisen somit alle auf einen möglichen Zusammenhang zwischen PPS Aktivität und Insulinsekretion hin.
Die Befunde mit exogenem Insulin zeigen aber auch die Möglichkeit auf, daß das während einer Inkubation von Inseln mit Glucose in das Inkubationsmedium sezernierte Insulin von sich aus die Aktivität des PPS und den NADPH-Gehalt der Insel vermindern könnte. Daraus ergibt sich, daß diejenigen Autoren, die bisher keine Abhängigkeit des PPS von der Glucosekonzentration nachweisen konnten, möglicherweise einem experimentellen Irrtum unterlagen, der darin besteht, daß das unter ihren Versuchsbedingungen von den Inseln in das Medium gelangte Insulin von sich aus den PPS gehemmt hat. Sie konnten somit, da die Menge an freigesetztem Insulin mit der Glucosekonzentration zunimmt, keinen Glucose abhängigen Anstieg der PPS Aktivität finden.

Es war daher Aufgabe dieser Arbeit, die Aktivität des PPS unter solchen Bedingungen zu untersuchen, die eine Anreicherung von Insulin im Medium, während der Inkubation vermieden oder doch wenigstens verminderten.
Wie aus den Arbeiten von Hedeskov und Capito (16) und von Snyder et al. (14) hervorgeht, die in ihren Versuchen 5 - 15 Inseln in 10 - 50 µl Medium 120 - 180 Minuten lang und in Gegenwart von 16,7 mmol/l Glucose im Medium inkubierten, fanden sich am Schluß der Inkubation ca. 5 000 bzw. 10 000 µE Insulin/ml.
Wir haben als erstes Untersuchungen unter den obengenannten Bedingungen nachvollzogen.
Abhängig von der Glucosekonzentration fanden auch wir - wie in Abbildung 4 zu sehen ist - eine Abnahme des prozentualen Anteils und nur eine geringe, nicht signifikante Steigerung der absoluten Rate der Glucoseoxidation über den PPS. Berechnet auf 1 ml Inkubationsmedium wurden bereits 1 385 µE Insulin in Gegenwart von 5,6 mmol/l Glucose und 10 431 µE Insulin in Gegenwart von 16,7 mmol/l gemessen. Unsere Ergebnisse stimmen damit voll und ganz mit den oben aufgeführten überein.

Zieht man nun in Betracht, daß bereits eine so geringe Insulinkonzentration wie 400 µE/ml eine Hemmung der PPS-Aktivität hervorruft (30), so kommt man logischerweise zu dem Schluß, daß bei den genannten Untersuchungen die PPS-Aktivität ebenfalls durch die extrem hohen Insulinkonzentrationen im Medium gehemmt worden ist.

Im ersten Augenblick erscheint die Konzentration von 1 385 µE/ml Insulin sehr hoch, die wir in Gegenwart von 5,6 mmol/l Glucose - einer Glucosekonzentration, die die Insulinsekretion kaum stimuliert - im Medium fanden. Wenn man aber bedenkt, daß im allgemeinen 10-30 µE Insulin, wahrscheinlich durch Beschädigung der Oberfläche der ß-Zellen, mit einer Insel ins Inkubationsmedium gelangen und daß 10 Inseln in einem so kleinen Volumen wie 0,15 ml inkubiert werden, dann erklärt sich daraus die relativ hohe Konzentration von 1 385 µE Insulin/ml. Ähnliches gilt auch für die sehr hohe Konzentration von 10 431 µE IRI bei Anwesenheit von 16,7 mmol/l Glucose.

Die weiter oben aufgezeigten Überlegungen führten uns dazu, in den folgenden Versuchen die Inkubationsbedingungen so zu verändern, daß damit einer Akkumulation von Insulin im Medium vorgebeugt wurde. So wurde die Anzahl der Langerhansschen Inseln sowie die Inkubationszeit vermindert bzw. das Volumen des Inkubationsmediums erhöht. Unter diesen Versuchsbedingungen fanden sich am Ende der Inkubation bei Anwesenheit von 5,6 mmol/l Glucose nur 111 µE/ml, bei 16,7 mmol/l Glucose 891 µE/ml Insulin. Dies ist weit weniger als in obigem Versuch (1 385 bzw. 10 431 µE/ml).
Jetzt konnte bei Zugabe von 16,7 mmol/l Glucose gegenüber den Ausgangswerten mit 5,6 mmol/l Glucose eine Steigerung des prozentualen Anteils um das zweifache sowie der absoluten Rate des PPS um das achtfache gesehen werden (Abbildung 6).

Diese Befunde zeigen bereits, daß dann, wenn man eine Akkumulation von Insulin im Medium verhindert (verglichen mit Versuch I), die Erhöhung der Glucosekonzentration auch eine Zunahme der PPS-Aktivität zur Folge hat.
Da jedoch auch jetzt - in Bezug auf die Untersuchungen von Ammon und Verspohl (30) - ein inhibitorischer Effekt des, besonders des in Gegenwart von 16,7 mmol/l Glucose sezernierten Insulins in Höhe von 891 µE/ml auf den PPS nicht auszuschließen war, unternahmen wir einen weiteren Versuch, die Insulinmenge im Medium zu senken.
Wir verwendeten dazu GPAIS (guinea pig anti-insulin serum), das so dosiert war, daß es das im Medium befindliche Insulin fast vollständig binden konnte. Ausgehend von der Überlegung, daß in Gegenwart von 16,7 mmol/l Glucose ca. 600-800 µE/ml von 5 Langerhansschen Inseln freigesetzt werden, wurde der Antikörper in einer Konzentration angewendet, die 800 µE IRI zu binden vermochte.
Wie Abbildung 9 zeigt, wurde durch diesen Antikörper-Einsatz tatsächlich weniger als 100 µE freies Insulin/ml gefunden. Interessanterweise ist andererseits unter diesen Bedingungen die durch Glucose induzierte Gesamtmenge an Insulin höher als bei Abwesenheit von GPAIS.
Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Untersuchungen von Hahn et al. (46) und Ziegler et al. (47), die zu ähnlichen Befunden kamen und die sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen sind, daß in Gegenwart von GPAIS bereits sezerniertes Insulin die durch Glucose stimulierte Freisetzung nicht mehr hemmt.

Wurde in Anwesenheit von GPAIS der Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf die PPS-Aktivität bestimmt (Abbildung 8), so konnte jetzt sowohl eine Steigerung des prozentualen Anteils des PPS an der Glucoseoxidation (von 2,3 auf 3,2 bzw. 9,4 %) als auch der absoluten Rate des Glucoseumsatzes im PPS (von 17,7 auf 42,6 bzw. 123,4 pmol/ 90 min / 5 Inseln abhängig von der Glucosekonzentration beobachtet werden.

Diese Ergebnisse lassen somit den Schluß zu, daß die Aktivität des PPS in Langerhansschen Inseln - unter der Voraussetzung, daß eine Akkumulation von Insulin im Inkubationsmedium vermieden wird - von der Glucosekonzentration abhängig ist.

Sie stehen damit auch im Einklang mit dem beobachteten Anstieg des NADPH/NADP - bzw. des 6-PG/G-6-P - Quotienten (21,44) in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration. Der Einfluß des durch die Glucosestimulation freigesetzten Insulins konnte bei letzteren Untersuchungen dadurch ausgeschaltet werden, daß diese Parameter bereits nach 5 bzw. 15-minütiger Inkubation gemessen wurden.
Mit einer solch kurzen Inkubationszeit konnte man allerdings bei der hier angewandten Methode nicht auskommen, da man zur Messung des PPS auf die Anreicherung von $^{14}CO_2$ und THO im Medium angewiesen ist. Nach 5 bis 15 Minuten haben sich jedoch noch keine nachweisbaren Mengen $^{14}CO_2$ oder THO angesammelt. Dies ist erst nach etwa 90 Minuten der Fall.

Beleuchtet man diese Ergebnisse hinsichtlich ihrer physiologischen Relevanz, so ist zunächst zu sagen, daß unter in vivo Bedingungen freigesetztes Insulin durch den Blutstrom ständig von den Inseln wegtransportiert wird (48). Eine Akkumulation größerer Insulinmengen um die Insel erscheint wenig wahrscheinlich. Allerdings könnten höhere Konzentrationen an Insulin, die sowohl die PPS-Aktivität als auch die weitere Sekretion von Insulin hemmen, bei maximaler Stimulation der Insulinsekretion auftreten.

Auf Grund der hier aufgeführten Befunde kann jedoch keine eindeutige Aussage über die Rolle des PPS bei der durch Glucose induzierten Insulinsekretion gemacht werden. Obwohl die PPS-Aktivität mit der Glucosekonzentration ansteigt, kann aus dieser Tatsache allein noch auf keine Signalfunktion geschlossen werden.
Andererseits ist es möglich, daß die Funktion des PPS darin besteht, Cofaktoren zu bilden, z.B. für die Sekretion notwendiges NADPH. In diesem Fall könnte die Konzentration eines solchen Cofaktors, falls sie von der Aktivität des PPS abhängt, die Ansprechbarkeit der ß-Zelle auf ein Signal modulieren, das entweder vom Glucosemolekül selbst oder über einen bei seinem Abbau entstehenden Metaboliten gegeben wird.

Gerade die letztere Möglichkeit veranlaßte uns jetzt zu prüfen, ob durch exogenes Insulin auch die Insulin freisetzende Wirkung solcher Stimulantien gehemmt wird, von

denen man annehmen muß, daß sie ihr Signal zur Insulinsekretion 1. in einer von der Glucose verschiedenen Weise und 2. auch untereinander verglichen in verschiedener Weise geben und von denen bekannt ist, daß sie den PPS nicht beeinflussen (24).

4.2 Einfluß von exogenem Insulin auf die durch p-Chlormercuribenzoat, Theophyllin, Tolbutamid, Arginin und Leucin induzierte Insulinsekretion

Es liegen bereits eine Reihe von Ergebnissen vor, die für die Insulinsekretion einen negativen Feedback-Mechanismus postulieren. Die Autoren haben dabei in ihren Untersuchungen entweder die Abhängigkeit der Insulinsekretion einer einzelnen Insel in einem konstanten Volumen von einer unterschiedlichen Zahl von Inseln geprüft und dabei gefunden, daß mit steigender Anzahl der Inseln die Sekretionsleistung jeder einzelnen abnahm (49), oder sie haben dem Inkubationsmedium verschiedene Konzentrationen an exogenem Insulin zugesetzt (30,47) und mit steigender Konzentration dieses Zusatzes eine Hemmung der endogenen Insulinsekretion gesehen.

Bis jetzt ist jedoch nur die durch Glucose induzierte Insulinsekretion auf diesen Rückkopplungsmechanismus hin untersucht worden. Dabei wurde festgestellt, daß die Basalsekretion der Inseln unverändert erhalten blieb, jedoch wenn Glucose in Konzentrationen von 1,5 oder 3,0 - 3,5 mg/ml (25,30,50) im

Medium gelöst war, bei Zugabe von exogenem Insulin eine deutliche Hemmung der Insulinsekretion auftrat.
Im weiteren Verlauf dieser Arbeit galt es nun zu untersuchen, ob auch andere Stimulatoren der Insulinsekretion durch diesen negativen Feedback-Mechanismus in ihrer Wirkung beeinflußbar sind.
Zu diesem Zweck wurden folgende Substanzen: p-Chlormercuribenzoat, Aminophyllin, Tolbutamid und die Aminosäuren Arginin und Leucin zusammen mit Glucose in Konzentrationen von 5,6 oder 11,1 mmol/l eingesetzt und der Einfluß von 100, 200, 400 oder 800 µE IRI/ml auf die durch sie induzierte Insulinsekretion untersucht.
Die jeweiligen Ergebnisse werden getrennt diskutiert.

1.) p-Chlormercuribenzoat (p-CMB)

p-CMB gehört zu den Thiol-Reagenzien und es liegen Untersuchungen von Hellmann et al. (51) und Bloom et al. (52) vor, die mit diesen Reagenzien eine rasche Insulinfreisetzung erzielen konnten. p-CMB stimuliert dabei additiv zur Glucose die Insulinsekretion und zwar schon ab einer Konzentration von 0,01 mM (53). Die Stimulation geht jedoch nicht mit einer Steigerung des Glucosemetabolismus einher (53).
Dagegen wird angenommen, daß p-CMB durch Reaktion mit SH-Gruppen auf oder in der Zellmembran (54,55) der ß-Zelle

- wahrscheinlich unter Bildung von Mercaptiden (52) - zur Insulinfreisetzung führt, da es nicht oder nur sehr langsam die Membran passieren kann.
Die Bildung von schnell reversiblen Mercaptiden setzt jedoch das Vorhandensein von freien SH-Gruppen in der ß-Zellmembran voraus. Im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen (56) in diesem Labor wurde die Hypothese aufgestellt, daß Thiol - Gruppen der ß-Zellmembran durch den Redox-Zustand des intrazellulären GSH/GSSG - Quotienten moduliert werden. Dieser wiederum könnte durch den NADPH/NADP - Quotienten beeinflußt werden und damit im Zusammenhang mit der PPS Aktivität stehen.
Exogenes Insulin seinerseits führt zu einer Abnahme der PPS Aktivität und des NADPH/NADP - Quotienten (30) und damit möglicherweise zu einer Abnahme von intrazellulärem GSH.
Wurde nun in der vorliegenden Arbeit die durch p-CMB induzierte Insulinsekretion - Glucose war nur in substimulatorischer Konzentration von 5,6 mmol/l im Medium vorhanden - dem Einfluß von exogenem Insulin ausgesetzt, so zeigte bereits der Zusatz von 100 µE/ml eine signifikante Hemmung der Insulinfreisetzung.
Legt man nun die zuvor aufgezeigte Arbeitshypothese zu Grunde, so könnte dieses Ergebnis darauf hinweisen, daß exogenes Insulin - das den NADPH/NADP - Quotienten senkt (30) - über eine hemmende Wirkung auf die Aktivität des

PPS die Ansprechbarkeit der ß-Zelle auf die stimulierende Wirkung von p-CMP herabsetzt. Die Anzahl der reduzierten SH-Gruppen wird durch die gesenkte PPS-Aktivität vermindert und damit vermutlich die Zahl der Bindungsstellen für p-CMB, was in einer verminderten Insulinsekretion zum Ausdruck kommt.

2. Theophyllin

Zu den vorliegenden Versuchen wurde das lösliche Salz Aminophyllin = Theophyllin-äthylendiamin verwendet.

Die stimulierende Wirkung der Methylxanthine auf die Insulinfreisetzung wird der ihnen eigenen Hemmung der Phosphodiesterase in der ß-Zelle zugeschrieben, da nach Theophyllingabe eine Zunahme an c-AMP in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte beobachtet wurde (57,58). Diese Wirkung der Methylxanthine - dies wurde bereits von vielen Autoren beschrieben - ist jedoch bei Anwesenheit von Glucose am größten (57,59,60). Zum gleichen Ergebnis kamen Ammon und Steinke (24). Sie fanden außerdem, daß nach Vorbehandlung der Ratten mit 6-Aminonicotinamid - einem Antimetaboliten von Nicotinamid in der Nucleotid-pyridinsynthese (61) - die durch Glucose und Aminophyllin induzierte Insulinfreisetzung sowie die CO_2 - Bildung aus $\left[1\text{-}^{14}C\right]$ Glucose vermindert sind.
Obwohl Aminophyllin selbst die Aktivität des PPS nicht steigert, scheint doch seine sekretorische Wirkung auch vom Ablauf des PPS abhängig zu sein (24).

Exogenes Insulin vermindert - wie bereits erwähnt - die Aktivität des PPS. In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob auch die durch Glucose plus Aminophyllin induzierte Insulinsekretion durch den Zusatz verschiedener Konzentrationen an exogenem Insulin gehemmt wird. Dies ist wirklich der Fall, wir fanden eine von der Dosis an exogenem Insulin abhängige Senkung der Insulinsekretion. Da, wie Abbildung 14 zeigt, die Hemmung der durch Glucose und Aminophyllin stimulierten Insulinsekretion durch exogenes Insulin nicht vollständig ist, könnte man argumentieren, daß nur der Anteil der Glucosestimulation davon betroffen wird. Wir glauben aber auf Grund der Ergebnisse in Abbildung 18, nach denen die stimulierende Wirkung von 11,1 mmol/l Glucose allein durch exogenes Insulin in sehr viel geringerem Ausmaß gehemmt wird als die kombinierte Wirkung von Glucose und Aminophyllin, daß in den Hemmeffekt des exogenen Insulins auch die stimulierende Wirkung des Aminophyllins einbezogen ist.
Unser Ergebnis steht somit im Einklang mit Untersuchungen von Sodoyez et al. (62), die zwar nicht Aminophyllin, sondern c-AMP zum Inkubationsmedium gegeben haben.

Auf Grund der vorliegenden Versuche und der oben aufgeführten Befunde kann vermutet werden, daß die sekretorische Wirkung von Glucose + Aminophyllin von der PPS-Aktivität abhängig ist bzw. der negative Rückkopplungseffekt der Insulinsekretion wiederum über die PPS-Aktivität gesteuert wird und auf diese Art und Weise die Hemmwirkung auf die

durch Glucose und Aminophyllin hervorgerufene Insulinsekretion zustande kommt.

3.) Tolbutamid

Tolbutamid gehört zu den oralen Antidiabetika der Sulfonylharnstoffreihe. Der Mechanismus der Tolbutamidwirkung ist bis heute nicht geklärt. Doch auch Tolbutamid benötigt das Vorhandensein von Glucose und zwar in höheren Konzentrationen, um die Insulinsekretion zu induzieren (24,63). Die Wirkung des Tolbutamids ist dabei anscheinend nicht an den Metabolismus der Glucose gebunden, da sie auch bei Hemmung der Glucosephosphorylierung durch Mannoheptulose oder 2-Deoxyglucose (3,64) sowie nach Blockade des PPS durch 6-AN (24) vorhanden ist. Dagegen berichten Montague und Taylor, daß durch Tolbutamid der Gehalt an Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat in Ratteninseln ansteigt (65), und Ashcroft et al. (66) finden eine vermehrte Lactat-Bildung. Diese Befunde würden für eine Beteiligung des Glucosestoffwechsels an der Tolbutamidwirkung sprechen.

Andere Autoren wiederum postulieren eine Wirkung auf das c-AMP - System, d.h. eine hemmende Wirkung auf die Phosphodiesterase (67-69) bzw. eine direkte Membranwirkung auf die Aktivität der Adenylatcyclase (70).

Andererseits konnten neuere Untersuchungen in unserem Labor zeigen, daß durch die Verminderung von NADPH durch Methylenblau - einem Oxidationsmittel für NADPH - und durch die Verminderung von GSH, die einerseits durch Zusatz von

Diamid - einem Oxidationsmittel für GSH (71) - sowie andererseits durch t-Butylhydroperoxid - einem Substrat der Glutathionperoxidase (72,73) - erzielt worden war, die durch Tolbutamid induzierte Insulinsekretion gesenkt war (74).

Auch durch den Zusatz von exogenem Insulin kann die durch Tolbutamid und Glucose hervorgerufene Insulinfreisetzung gesenkt werden, und zwar dosisabhängig von der zugesetzten Insulinmenge, wie Abbildung 15 zeigt.

Die beiden oben genannten Befunde würden zwar für eine Beeinflussung der Tolbutamidwirkung durch das NADPH - GSH - System sprechen, jedoch sind hier noch weitere Untersuchungen zur Abklärung der Widersprüche, insbesondere bezüglich des Glucosestoffwechsels, erforderlich.

Es ist bei den Versuchen mit exogenem Insulin ebenfalls zu sehen, daß die Hemmung der durch Glucose und Tolbutamid induzierten Insulinfreisetzung - auch bei Zusatz höherer Konzentrationen an exogenem Insulin - nicht vollständig ist. Doch gilt hier, wie bei Aminophyllin bereits diskutiert, daß die Hemmung auf die durch Glucose(11,1 mM)per se induzierte Sekretion minimal ist und daraus gefolgert werden kann, daß auch Tolbutamid in die Hemmwirkung des exogenen Insulins einbezogen ist.

4.) Leucin und Arginin

Die stimulierende Wirkung einiger Aminosäuren, insbesondere von Leucin und Arginin, wurde von mehreren Autoren in vitro nachgewiesen (75,76,77). Ihr Wirkungsmechanismus ist jedoch

noch ziemlich unbekannt. Dabei scheint der Abbau von Arginin in der ß-Zelle nicht der wesentliche Faktor seiner sekretorischen Wirkung zu sein (78). Leucin dagegen wird vollständig in der ß-Zelle metabolisiert und auch seinen Metaboliten wird eine wichtige Funktion bei der Insulinsekretion zugeschrieben (79).

Von Charles et al. (80) und Selawry et al. (81) wurde der c-AMP-Spiegel nach Zusatz von Arginin bzw. Leucin in den Inselzellen gemessen und dabei jeweils ein Anstieg gesehen. Außerdem konnte bei Pankreaskulturen der Ratte (82) bzw. des Kaninchens (83) eine gegenseitige Verstärkung der sekretorischen Wirkung von Theophyllin und Leucin beobachtet werden. Inwieweit der Gehalt der ß-Zelle an c-AMP jedoch Einfluß auf die durch die Aminosäuren induzierte Sekretion von Insulin hat, ist noch nicht eindeutig geklärt.

Als weiteres ist bemerkenswert, daß zumindest Arginin die Anwesenheit von Glucose benötigt, um seine sekretorische Wirkung zu entwickeln, Leucin dagegen nicht (79). Allerdings kann die Leucinwirkung durch Glucose verstärkt werden.

Auf Grund dessen wurde bei den vorliegenden Versuchen zu Arginin die Glucose in einer Konzentration von 11,1 mmol/l, zu Leucin dagegen nur in der substimulatorischen Konzentration von 5,6 mmol/l zugesetzt. Beidesmal konnte jedoch eine Hemmung der Insulinfreisetzung durch den Zusatz an exogenem Insulin erzielt werden (Abbildung 16 und 17), in Bezug auf das Ausmaß dieser Hemmung gilt das gleiche, wie bereits beim Aminophyllin - bzw. Tolbutamid Zusatz diskutiert.

In anderen Untersuchungen in unserem Labor wurde der NADPH-Gehalt der Langerhansschen Inseln gemessen und zumindest für das Leucin konnte ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg des NADPH/NADP - Quotienten und der durch diese Aminosäure hervorgerufenen Insulinfreisetzung gesehen werden, da die Insulin freisetzende Wirkung von Leucin durch Methylenblau gehemmt werden konnte (84). Ob der Anstieg des NADPH-Gehaltes dabei über den PPS und/oder andere Stoffwechselwege reguliert wird, ist noch nicht geklärt.

Legt man andererseits die bereits des öfteren aufgezeigte Annahme zu Grunde, daß der GSH-Gehalt der Insel von ihrem Gehalt an NADPH abhängt, so kann zumindest vermutet werden, daß die Aminosäuren, die entweder NADPH zu ihrer sekretorischen Wirkung brauchen (Arginin) oder bilden (Leucin) (84), den GSH/GSSG - Quotienten beeinflußen und damit evt. den Redoxzustand von SH-Gruppen auf oder in der Zellmembran.

Umgekehrt wäre über diesen Mechanismus die bereits früher beschriebene Hemmwirkung des exogenen Insulins auf die durch Leucin bzw. Arginin induzierte Insulinsekretion zu erklären, denn exogenes Insulin erniedrigt den NADPH/NADP - Quotienten (30).

Zusammenfassend läßt sich zu den aufgeführten Ergebnissen sagen:

gleich, welcher Stimulus verwendet wurde, mit exogenem Insulin konnte jeweils eine Hemmung auf die Insulin frei-

setzende Wirkung dieser Substanzen erzielt werden. Da exogenes Insulin PPS und NADPH/NADP - Quotienten erniedrigt (30), andererseits letzterer in der Insel mit dem GSH/GSSG - Quotienten korreliert (85), wäre folgender, gemeinsamer Mechanismus zu diskutieren:

Glucose, p-Chlormercuribenzoat, Aminophyllin, Tolbutamid, Arginin und Leucin geben auf verschiedene Weise das Signal zur Insulinsekretion.

Die Empfindlichkeit jedoch, mit der die ß-Zelle auf diese Signale reagiert, könnte von der Aktivität des PPS, des NADPH/NADP - und des GSH/GSSG - Quotienten abhängen.

Durch diese Faktoren wird evt. der Redoxzustand der freien SH-Gruppen in der Membran der ß-Zelle moduliert, die wahrscheinlich am Sekretionsvorgang beteiligt sind.

Da exogenes Insulin oben genannte Parameter erniedrigt, wäre denkbar, daß es auf diese Weise unspezifisch für das jeweils spezielle Signal, die Ansprechbarkeit der ß-Zelle kontrolliert. Exogenes Insulin würde damit verhindern, daß durch maximale, ungezügelte Stimulation der Sekretion die Gefahr einer Hypoglykämie hervorgerufen wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1

Es galt die Frage zu beantworten, ob die Aktivität des Pentosephosphatshunts (PPS) in Langerhansschen Inseln der Ratte in vitro von der Konzentration der Glucose abhängt. Dabei wurden frühere Ergebnisse aus diesem Arbeitskreis berücksichtigt, nach denen bei längerer Inkubation von Pankreasinseln sezerniertes Insulin die Aktivität des PPS hemmen kann.

5.2

Bei Inkubation von 15 Langerhansschen Inseln in 0,15 ml über 180 Minuten bleibt bei steigender Glucosekonzentration der prozentuale Anteil des PPS am Glucoseabbau unverändert, die absolute Rate steigt nur geringfügig an. Im Medium finden sich dabei Insulinkonzentrationen zwischen 1 385 und 10 431 µE/ml.

5.3

Werden die Inkubationsbedingungen dahingehend geändert, daß eine derartige Akkumulation von Insulin reduziert wird, d.h. daß das Volumen vergrößert, die Inselanzahl und die Inkubationszeit vermindert werden (5 Inseln in 1 ml über 90 Minuten inkubiert), so kann man jetzt - bei Insulinkonzentrationen zwischen 111 und 891 µE/ml - gleichzeitig

mit einer Erhöhung der Glucosekonzentration im Medium von 5,6 auf 16,7 mmol/l einen Anstieg des Prozentsatzes sowie der absoluten Rate der Glucoseoxidation über den PPS beobachten.

5.4

Wird unter den in Punkt 3 genannten Bedingungen durch Zusatz von GPAIS (guinea pig anti-insulin serum) ein Großteil des sezernierten, freien Insulins abgefangen (jetzt nur noch 46 bzw. 81 µE/ml am Ende der Inkubation), so findet sich eine von der Glucosekonzentration abhängige Steigerung der PPS Aktivität. Der prozentuale Anteil beträgt 2,3 bzw. 3,2 bzw. 9,4 %, die absolute Rate 17,7 bzw. 42,6 bzw. 123,4 pmol/90 min/5 Inseln.

5.5

Aus diesen Ergebnissen kann gesehen werden, daß die Aktivität des PPS in Langerhansschen Inseln - unter der Voraussetzung, daß eine Akkumulation von Insulin im Inkubationsmedium vermieden wird - von der Glucosekonzentration abhängig ist.

5.6

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob exogenes Insulin auch die Insulin freisetzende Wirkung solcher Stimulantien hemmt, von denen man annehmen muß, daß sie ihr Signal zur Insulinsekretion 1. in einer

von der Glucose verschiedenen Weise und 2. auch untereinander verglichen in verschiedener Weise geben.

5.7

Zu diesem Zweck wurden folgende Substanzen eingesetzt: p-Chlormercuribenzoat, Aminophyllin, Tolbutamid und die Aminosäuren Leucin und Arginin zusammen mit Glucose in Konzentrationen von 5,6 oder 11,1 mmol/l und der Einfluß von 100, 200, 400 oder 800 µE IRI/ml auf die durch sie induzierte Insulinsekretion untersucht.

5.8

Es konnte jeweils ein deutlicher Hemmeffekt des exogenen Insulins auf die durch p-Chlormercuribenzoat, durch Aminophyllin, durch Tolbutamid, durch Arginin und die durch Leucin induzierte Insulinsekretion beobachtet werden.

5.9

An Hand früherer Ergebnisse aus diesem Labor konnte gezeigt werden, daß exogenes Insulin die Aktivität des PPS, den NADPH/NADP - und den GSH/GSSG - Quotienten von isolierten Pankreasinseln senkt.
Es wäre daher denkbar, daß exogenes Insulin auf diese Weise unspezifisch für das jeweils spezielle Signal, die Ansprechbarkeit der ß-Zelle kontrolliert. Es könnte damit verhindern, daß durch maximale, ungezügelte Stimulation der Sekretion die Gefahr einer Hypoglykämie hervorgerufen wird.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) Matschinsky,F.M.,Landgraf,R.,Ellerman,J. and Kotler-Brajtburg,J.:
Glucoreceptor mechanism in islets of Langerhans.
Diabetes 21, 555 - 569 (1972)

2) Grodsky,G.M.,Batts,A.A.,Bennett,L.L.,Vcella,C., McWilliams,N.B. and Smith,D.F.:
Effects of Carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas.
Am.J.Physiolog. 205, 638 - 644 (1963)

3) Coore,H.G. and Randle,P.J.:
Regulation of insulin secretion, studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro.
Biochem.J. 93, 66 - 78 (1964)

4) Hellman,B.,Idahl,L.A.,Lermark,A.,Sehlin,J.,Simon,E. and Täljedal,I.B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. I Transport of mannoheptulose and the dynamics of insulin release.
Molec.Pharmacol. 8, 1 - 7 (1972)

5) Sehlin,J.:
Effects of mannoheptulose on the dynamics of glucose oxidation in the pancreatic ß-cells.
FEBS Letters 30, 45 - 48 (1973)

6) Cahill,G.F.,Hastings,A.B.,Ashmore,J.,Zottu,S.:
Studies on Carbohydrate Metabolism in Rat Liver Slices X. Factors in the Regulation of Pathways of Glucose Metabolism.
J.Biol.Chem. 230, 125 - 135 (1958)

7) Ashcroft,S.J.H.,Bassett,J.M. and Randle,P.J.:
Insulin Secretion Mechanism and Glucose Metabolism in Isolated Islets.
Diabetes 21, 538 - 545 (1972)

8) Sussman,K.,Vaughan,G and Stjernholm,M.:
Factors controlling insulin secretion in the perfused isolated rat pancreas.
Diabetes, Proc. 6 th.Congr.int.Diabetes Fed.Stockholm J.C.S. No 172, 123 - 137 (1967)

9) Krass,M.E.,Labella,F.S.:
Hexomonophosphate shunt in endocrine tissuses.
Biochem.Biophys.Acta 148, 384 (1967)

10) Dumont,J.:
Ann.Soc.Sci.med.nat.Brux.13, 176 - 181 (1965)

11) Hashizmure,K.,Onaya,T. and Sato,A.:
The role of PPS in thyreotropin-induced thyreoid hormone secretion: in vivo and in vitro studies with 6-AN in mouse thyroids.
Endocrinology 97, 962 - 968 (1975)

12) Weaver,G. and Landau,B.R.:
Contribution of the pentose cycle to glucose metabolism by adrenal cortex in vitro.
Endocrinology 73, 640 -644 (1963)

13) Ashcroft,S.J.H.,Weerasinghe,L.C.C.,Bassett,J.M. and Randle,P.J.:
The Pentose Cycle and Insulin Release in Mouse Pancreatic Islets.
Biochem.J. 126, 525 - 532 (1972)

14) Snyder,P.J.,Kashet,S. and O'Sullivan,J.B.:
Pentose Cycle in isolated islets during glucose-stimulated insulin release.
Am.J.Physiol. 219, 876 - 880 (1970)

15) Hostetler,K.,Cooperstein,S.J.,Landau,B.J. and Lazarow,A.:
Pathways of glucose metabolism in the isolated islet of the goosefish in vitro.
Am.J.Physiol. 211, 1057 -1062 (1966)

16) Hedeskov,C.J. and Capito,K.:
The Pentose Cycle and Insulin Release in Isolated Mouse Pancreatic Islets during Starvation.
Biochem.J. 152, 571 - 576 (1975)

17) Keen,H.,Sells,R.,Jarrett,R.J.:
A Method for the Study of the Metabolism of Isolated Mammalian Islets of Langerhans and Some Preliminary Results.
Diabetologica 1, 28 -32 (1966)

18) Jarrett,R.J.,Keen,H.:
Glucose Metabolism of Isolated Islets of Langerhans.
The Lancet I, 633 - 635 (1966)

19) Montague,W.,Taylor,K.W.:
Pentitols and Insulin Release by Isolated Rat Islets of Langerhans.
Biochem.J. 109, 333 - 339 (1968)

20) Montague,W.,Taylor,K.W.:
The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Insulin Secretion.
In: The Structure and Metabolism of Pancreatic Islets, pp 263 -274, Pergamon Press, Oxford

21) Ammon,H.P.T., Akhtar,M.S.:
Publikation in Vorbereitung

22) Heinze,E. and Steinke,J.:
Glucose Metabolism of isolated pancreatic islets: Difference between fetal, newborn and adult rats.
Endocrinology 88, 1259 - 1263 (1971)

23) Ammon,H.P.T. and Steinke,J.:
6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In vitro studies in rats.
Diabetes 21, 143 - 148 (1972)

24) Ammon,H.P.T. and Steinke,J.:
Effect of 6-Aminonicotinamide on insulin release and C-14 glucose oxidation by isolated pancreatic rat islets: Difference between glucose, tolbutamide and aminophylline.
Endocrinology 91, 33 - 38 (1972)

25) Iversen,J. and Miles,D.W.:
Evidence for a Feedback Inhibition of Insulin on Insulin Secretion in the Isolated, Perfused Canine Pancreas.
Diabetes 20, 1 - 9 (1971)

26) Rapoport,A.M.,Ohira,S.,Coddling,J.A.,Empey,G.,Kalnius,A., Lin,B.J. and Haist,R.E.:
Effects of insulin output and on pancreatic blood flow of exogenous insulin infusion into in situ isolated portion of the pancreas.
Endocrinology 91, 168 - 176 (1972)

27) Frerichs,H.,Reich,U. and Creutzfeld,W.:
Insulin secretion in vitro.
Klin.Wschr. 43, 136 - 141 (1965)

28) Assal,J.Ph.,Katsilambros,L.,Steinke,J.:
Insulin Feedback Inhibition: Metabolic Changes in Incubated Rat Islets of Langerhans.
Brief Notes and Comments.

29) Loreti,J.C.,Dunbar,S.Ch. and Foà, P.P.:
The Autoregulation of Insulin Secretion in the Isolated Pancreatic Iselts of Lean (obOb) and Obese-Hyperglycemic (obob) Mice.
Diabetologica 10, 309 - 315 (1974)

30) Ammon,H.P.T. and Verspohl,E.:
Pyridine Nucleotides in Pancreatic Islets during Inhibition of Insulin Release by Exogenous Insulin.
Endocrinology 99, 1469 - 1476 (1976)

31) Zawalich,W.S.,Karl,R.C.,Ferrendelli,J.A.,Matschinsky,F.M.:
Factors Govering Glucose Induced Elevation of cyclic 3`5` AMP Levels in Pancreatic Islets.
Diabetologia 11, 231 - 235 (1975)

32) Umbreit,W.W.,Burris,R.H. and Stauffer,J.P.:
Manometric and biochemical techniques.
5th Edition,Burgess Publishing Co.,Minneapolis,Minnesota, U.S.A. p 146 (1972)

33) Pfeiffer,E.F.,Melani,F.,Ditschuneit,H.,Schöffling,K.:
Radioimmunologische Bestimmung des Insulins.
Bull.schweiz.Akad.med.Wiss. 9, 276 -297 (1965)

34) Herbert,V.,Lau,K.S.,Gottlieb,Ch.W.,Bleichner,S.J.:
Coated Charcoal Immunoassay of Insulin.
J.Clin.Endocrinology 25, 1375 - 1389 (1965)

35) Lacy,P.E., Kostianovsky,M.:
Method for the isolation of intact islets of Langerhans from Rat Pancreas.
Diabetes 16, 35 (1967)

36) Katz,J.,Wood,H.G.:
The Use of $^{14}CO_2$ Yields from Glucose -1 - and -6-^{14}C for the Evaluation of the Pathways of Glucose Metabolism.
J.Biol.Chem. 238, 517 - 523 (1963)

37) Ashcroft,S.J.H. and Bassett,J.M.:
Isolation of Human Pancreatic Islets Capable of Releasing Insulin and Metabolising Glucose in Vitro.
The Lancet I , 888 - 889 (1971)

38) Keen,H.,Field,J.B. and Pastan,I.H.:
A simple method for in vitro metabolic studies using small volumes of tissue and medium.
Metabolism 12, 143 -147 (1963)

39) Soeldner,J.S. and Slone,D.:
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique,
Diabetes 14, 771 - 779 (1965)

40) Heding,L.G.:
Determination of Free and Antibody-Bound Insulin in Insulin Treated Diabetic Patients.
Horm.Metab.Res. 1 , 145 - 146 (1969)

41) Bassett, D.J.P. and Fisher,A.B.:
Pentose Cycle activity of the isolated perfused rat lung.
Am.J.Physiol. 231, 1527 - 1532 (1976)

42) Katz,J. and Wals,P.A.:
Pentose Cycle and Reducing Äquivalents in Rat Mammary-Gland Slices.
Biochem.J. 128, 879 (1972)

43) Jacob,H.S. and Jandel,J.H.:
Pentose Cycle in Erythrocyts
J.Biol.Chem. 241, 42 - 43 (1966)

44) Ammon,H.P.T.,Verspohl,E. and Wagner-Teschner,D.:
Possible Significance of NADPH in glucose-induced insulin release.
Publikation in Vorbereitung

45) Ammon,H.P.T.:
Effects of glucose and methylene blue (MB) on NADP, NADPH and insulin secretion of isolated pancreatic rat islets.
Arch.Pharmacol. 272 Suppl. R 1 (Abstract) (1973)

46) Hahn,H.J.,Menzel,R.,Gottschling,H.D.:
Enhancement of Glucose-Stimulated Insulin Secretion from Isolated Rat Pancreatic Islets by Human Insulin Antibodies.
Acta Endocrinologica 83, 123 - 132 (1976)

47) Ziegler,M.,Hahn,H.J. and Klatt,D.:
Influence of Isolated Insulin Antibodies on the Insulin Secretion of the Islets of Langerhans in Vitro.
Diabetologia 4, 148 -149 (1972)

48) Hellman,B. and Lermark,Å.:
Evidence for an Inhibitor of Insulin Release in the Pancreatic Islets.
Diabetologia 5, 22 - 24 (1969)

49) Dunbar,J.C.,McLaughlin,W.J.,Walsh M.-F.,J. and Foà,P.P.
Insulin Secretion and Glucose Uptake by Isolated Islets of Hamster. Effect of Insulin,Proinsulin and C-Peptide.
Horm.Met.Res. 8, 1 - 6 (1976)

50) Sodoyez,J.-C.,Sodoyez-Goffaux,F. and Foà,P.P.:
Evidence for an insulin-induced inhibition of insulin release by isolated islets of Langerhans.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 130, 568 (1969)

51) Hellman,B.,Idahl,L.Å.,Lermark,Å.,Sehlin,I. and Täljedal,I.B.:
Iodoacetamide-induced sensitisation of the pancreatic ß-cells to glucose stimulation.
Biochem.J. 132, 775 - 789 (1973)

52) Bloom,G.H.,Hellman,B.,Idahl,L.Å.,Lermark,Å.,Sehlin,J. and Täljedal,I.B.:
Effects of organic mercurials on mammilian pancreatic ß-cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem.J.129, 241 - 254 (1972)

53) Hellman,B.,Idahl,L.Å.,Lermark,Å.,Sehlin,J. and Täljedal,I.B.:
Membrane Sulfhydryl Groups and the Pancreatic Beta Cell Recognation of Insulin Secretagogues.
Biochem.J. 241 - 254 (1972)

54) Hellman,B.,Idahl,L.Å.,Lernmark,Å.,Sehlin,J.,Täljedal,I.B.:
Role of Thiol Groups in Insulin Release: Studies with Poorly Permeating Disulphides.
Mol.Pharmacology 9, 792 - 801 (1973)

55) Hellman,B.,Lernmark,Å.,Sehlin,J.,Söderberg,M. and Täljedal,I.B.:
On the possible role of thiol groups in the insulin-releasing action of mercurials, organic disulphides, alkylating agents and sulfonylureas.
Endocrinology 99, 1398 -1406 (1976)

56) Ammon,H.P.T., Akhtar,M.S.,Niklas,H. and Hegner,D.:
Inhibition of p-Chlormercuribenzoate- and Glucose - Induced Insulin Release in Vitro by Methylene Blue, Diamide and tert-Butyl-Hydroperoxide.
Mol.Pharmacology 13, 598 - 605 (1977)

57) Montague,W.,Cook,J.R.:
The Role of c-AMP in the Regulation of Insulin Release by Isolated Rat Islets of Langerhans.
Biochem.J. 122, 115 - 120 (1971)

58) Turtle,J.R., Kipnis,D.M.:
An adrenergic receptor mechanism for the control of cyclic 3`,5`-adenosine monophosphate synthesis in tissues.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 28, 797 - 802 (1967)

59) Brisson,G.R.,Malaisse-Lagae,F.,Malaisse,W.J.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. VII A proposed site of action for adenosine 3`,5`-cyclic monophosphate.
J.Clin.Investigation 51, 232 - 241 (1972)

60) Sussmann,K.E.,Vaughan,G.H.:
Insulin release after ACTH,glucagon and adenosine 3`,5`-cyclic monophosphate in the perfused isolated rat pancreas.
Diabetes 16, 449 -454 (1967)

61) Dietrich,L.S.,Friedland,J.M.,Kaplan,L.A.:
Pyridine nucleotide metabolism; Mechanism of action of the niacin antagonist, 6-aminonicotinamide.
J.Biol.Chem. 223, 964 - 968 (1958)

62) Sodoyez,J.-C.,Sodoyez-Goffaux,F. and Foâ,P.P:
Feedback Regulation of Insulin Secretion by Insulin: Role of 3`,5`-cyclic AMP.
In: The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets, Proc. of an International Symposium held in Umeå,Sweden, Feb. (1969)

63) Loubatières,A.,Mariani,M.M. et Chapal,J.:
Insulino-sécrétion étudée sur le pancréas isolé et perfusé du rat. I. Synergic entre glucose et sulfamides hypoglycémiants.
Diabetologia 6, 457 -466 (1970)

64) Malaisse,W.J.,Lea,M.A. and Malaisse-Lagae,F.:
The Effect of Mannoheptulose on the Phosphorylation of Glucose and the Secretion on Insulin.
Metabolism 17, No 2, 126 -132 (1968)

65) Montague,W.,Taylor,K.W.:
Islet-cell metabolism during insulin release.Effects of glucose, citrate, octanoate, tolbutamide, glucagon and theophylline.
Biochem.J. 115, 257 - 262 (1969)

66) Ashcroft,S.J.H., Hedeskov,C.J.,Randle,P.J.:
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem.J. 118, 143 -154 (1970)

67) Goldfine,J.D.,Perlman,R.,Roth,J.:
Inhibition of c-AMP phosphodiesterase in islet cells and other tissue by tolbutamide.
Nature 234, 295 - 296 (1971)

68) Sams,D.J.,Montague,W.:
The role of c-AMP in the regulation of insulin release.
Biochem.J. 129, 945 - 952 (1972)

69) Bowen,Y.,Lazarow,N.R.:
Glucose-mediated insulin release: c-AMP phospho-diesterase
Diabetes 22, 738 -743 (1973)

70) Bowen,Y.,Lazarow,N.R.:
Insulin Release from the Perfused Rat Pancreas, Mode of Action of Tolbutamide.
Biochem.J. 142, 385 - 389 (1974)

71) Kosower,E.M.,Correa,W. and Kinon,B.J.:
Glutathione VIII. Differentation among substrates by the thiol oxidizing agent diamide.
Biochim.Biophys.Acta 264, 39 - 44 (1972)

72) Srivastava,S.K.,Awasthi,Y.C. and Dentler,E.:
Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes - Organic hydro-Peroxides.
Biochem.J. 139, 289 - 295 (1974)

73) Sies,G.,Gerstenecker,C.,Menzel,H. and Flohé,L.:
Oxidation in the NADP system and release of GSSG from Hemoglobin free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides.
FEBS Letters 27, 171 - 175 (1972)

74) Ammon,H.P.T.,Niklas,H.:
Publikation in Vorbereitung

75) Milner,R.D.G.:
Stimulation of insulin secretion in vitro by essential aminoacids.
The Lancet I, 1075 - 1076 (1969)

76) Basabe,J.C.,Lopez,N.L.,Viktora,J.K. and Wolff,F.W.:
Insulin Secretion Studied in the Perfused Rat Pancreas.
Diabetes 20, 449 - 456 (1971)

77) Panten,U. and Christians,J.:
Effects of 2-endo-aminonorborane-2-carboxylic acid upon insulin secretion and fluorescence of reduced pyridine nucleotides of isolated perifused pancreatic islets.
Naunyn Schmiedeberg`s Arch.Pharmacol. 276, 55 - 62 (1973)

78) Lambert,A.E.:
Organ culture of fetal rat pancreas. II. Insulin release induced by amino acids and organic acids, by hormone peptides, by cationic alterations of the medium and by other agents.
Biochim.Biophys.Acta 174, 540 - 553 (1969)

79) Hellman,B.,Sehlin,J.,Täljedal,I.-B.:
Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidative metabolism of aminoacids in microdissected pancreatic islets.
Biochem.J. 123, 513 -521 (1971)

80) Charles,M.A.,Lawecki,J. and Grodsky,G.M.:
Cyclic AMP in pancreatic islets.
Diabetes 22 Suppl.1, 297 (1973)

81) Selawry,H.,Marcks,C.,Fink,G.,Lavine,R.,Cresto,J. and Recant,L.:
A mechanism for glucose-induced insulin release.
Diabetes 22 Suppl. 1, 295 (1973)

82) Milner,R.D.G.:
The mechanism by which leucine and arginine stimulate insulin release in vitro.
Biochim.Biophys.Acta 192, 154 - 156 (1969)

83) Malaisse,W.J.,Malaisse-Lagae,F,:
Stimulation of insulin secretion by monocarbohydrate metabolites.
J.Lab.Clin.Med. 72, 438 - 448 (1968)

84) Ammon,H.P.T. and Hoppe,E.:
Abstracts of the 11th Kongress der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Braunlage, Abstract 1 (1976)

85) Ammon,H.P.T.,Wagner-Teschner,D.,Grimm,A. and Niklas,H.:
Relationship between NADPH,Glutathione and Glucose-Induced Insulin Secretion in Pancreatic Rat Islets.
Venezia joint meeting of german and italian pharmacologists.
Abstract p 314 (1977)

Tabelle 1: Einfluß von Glucose auf die PPS Aktivität in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 10 Inseln in 0,15 ml KRB-Albumin Puffer während 180 Minuten unter Zusatz von 5,6; 11,1 oder 16,7 mmol/l Glucose.
Gemessen wurde die Glucoseoxidation entweder von [1-^{14}C]- oder [6-^{14}C] Glucose sowie die Glucoseutilisation von [5-^{3}H] Glucose. Der Betrag des "specific yield" von $^{14}CO_2$, der Prozentsatz des PPS und die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS wurden errechnet.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern; * = P < 0,001 vs 5,6 mmol/l Glucose

	Glucose (mM) 5,6	11,1	16,7
[1-^{14}C] Glucoseoxidation (pmol/180 min/10 Inseln)	55,4 ± 10,2 (16)	178,1 ± 24,4 *(16)	345,5 ± 47,1 *(16)
[6-^{14}C] Glucoseoxidation (pmol/180 min/10 Inseln)	29,9 ± 3,2 (16)	130,3 ± 10,5 *(16)	276,6 ± 37,9 *(16)
Glucoseutilisation (Bildung von THO aus [5-^{3}H] Glucose in pmol/180 min/10 Inseln)	754 ± 171 (6)	2852 ± 371 *(16)	4305 ± 255 *(29)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus [1-^{14}C] Glucose	0,073 ± 0,014 (16)	0,062 ± 0,009 (16)	0,080 ± 0,010 (16)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus [6-^{14}C] Glucose	0,040 ± 0,004 (16)	0,046 ± 0,004 (16)	0,064 ± 0,009 (16)
Pentose Phosphat Shunt (%)	2,1 ± 1,2 (8)	0,6 ± 0,2 (8)	0,5 ± 0,3 (8)
Absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS (pmol/180 min/10 Inseln)	15,8 ± 9,0 (8)	17,1 ± 5,7 (8)	21,5 ± 12,9 (8)

Tabelle 2: Insulinkonzentration im Medium nach Inkubation von 10 Inseln in 0,15 ml KRB-Albumin Puffer während 180 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 oder 16,7 mmol/l Glucose.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

Glucose Konzentration (mM)	Insulin im Inkubationsmedium (µE IRI/ml)	P Werte vs 5,6 mM	P Werte vs 11,1 mM
5,6	1 385 ± 358 (7)	--	--
11,1	6 632 ± 1 610 (12)	<0,05	--
16,7	10 431 ± 2 413 (5)	<0,001	n.s.

Tabelle 3: Einfluß von Glucose auf die PPS Aktivität in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml KRB-Albumin Puffer während 90 Minuten unter Zusatz von 5,6 oder 16,7 mmol/l Glucose.
Gemessen wurde die Glucoseoxidation entweder von [1-^{14}C]- oder [6-^{14}C] Glucose sowie die Glucoseutilisation von [5-^{3}H] Glucose. Der Betrag des "specific yield" von $^{14}CO_2$, der Prozentsatz des PPS und die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS wurden errechnet.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern; * = P < 0,001 vs 5,6 mmol/l Glucose

	Glucose (mM) 5,6	16,7
[1-^{14}C]Glucoseoxidation (pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	52,1 ± 16,8 (13)	199,7 ± 24,2 * (38)
[6-^{14}C]Glucoseoxidation (pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	37,9 ± 11,3 (13)	76,3 ± 5,9 * (36)
Glucoseutilisation (Bildung von THO aus [5-^{3}H] Glucose in pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	247 ± 162 (16)	987 ± 214 * (12)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus [1-^{14}C] Glucose	0,210 ± 0,067 (13)	0,202 ± 0,024 (38)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus [6-^{14}C] Glucose	0,153 ± 0,046 (13)	0,077 ± 0,006 (36)
Pentose Phosphat Shunt (%)	2,96 ± 4,19 (5)	5,98 ± 1,43 (18)
Absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS (pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	7,3 ± 10,3 (5)	59,0 ± 14,1 * (18)

Tabelle 4: Insulinkonzentration im Medium nach Inkubation von 5 Inseln in 1 ml KRB-Albumin Puffer während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6 oder 16,7 mmol/l Glucose.
Mittelwerte $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

Glucose Konzentration (mM)	Insulin im Inkubationsmedium (µE IRI/ml)	P Wert vs 5,6 mM
5,6	111,4 $\pm$ 18 (10)	--
11,1	891,6 $\pm$ 74 (14)	<0,001

Tabelle 5: Einfluß von Glucose auf die PPS Aktivität in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml KRB-Albumin Puffer während 90 Minuten unter Zusatz von 5,6; 11,1 oder 16,7 mmol/l Glucose und von GPAIS (guinea pig anti-insulin serum), um 800 µE IRI zu binden.
Gemessen wurde die Glucoseoxidation entweder von [1-^{14}C]- oder [6-^{14}C] Glucose sowie die Glucoseutilisation von [5-^{3}H] Glucose. Der Betrag des "specific yield" von $^{14}CO_2$, der Prozentsatz des PPS und die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS wurden errechnet.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern;
* = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001 vs 5,6 u./od. 11,1 mmol/l Glucose

	Glucose (mM) 5,6	11,1	16,7
[1-^{14}C] Glucoseoxidation (pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	105,1 ± 15,3 (24)	166,0 ± 28,3 (26)	258,8 ± 39,0** (35)
[6-^{14}C] Glucoseoxidation (pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	49,9 ± 5,9 (25)	62,3 ± 9,0 (25)	76,9 ± 17,3 (33)
Glucoseutilisation (Bildung von THO aus [5-^{3}H] Glucose in pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	765 ± 246 (11)	1335 ± 283 (9)	1316 ± 494 (8)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus [1-^{14}C] Glucose	0,137 ± 0,019 (24)	0,124 ± 0,021 (26)	0,237 ± 0,043** (35)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus [6-^{14}C] Glucose	0,065 ± 0,007 (25)	0,046 ± 0,006 (25)	0,065 ± 0,015 (33)
Pentose Phosphat Shunt (%)	2,3 ± 0,7 (9)	3,2 ± 0,9 (8)	9,4 ± 2,6 * (14)
Absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS (pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	17,7 ± 5,3 (9)	42,6 ± 12,0 (8)	123,4 ± 34,7 *** (14)

Tabelle 6: Insulinkonzentration im Medium nach Inkubation von 5 Inseln in 1 ml KRB-Albumin Puffer während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 oder 16,7 mmol/l Glucose. GPAIS (guinea pig anti-insulin serum) wurde eingesetzt, um 800 µE IRI zu binden, den Kontrollwerten wurde Normalserum zugesetzt.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

	Kontrolle		Zusatz von GPAIS			
Glucose Konzentration (mM)	Freies Insulin (µE IRI/ml)	P Werte vs 5,6 mM	Gesamtinsulin (µE IRI/ml)	P Werte vs 5,6 mM	Freies Insulin (µE IRI/ml)	P Werte vs 5,6 mM
5,6	111,4 ± 18 (10)	--	75,3 ± 9 (13)	--	32,9 ± 6 (13)	--
11,1	313,3 ± 77 (8)	<0,05	374,4 ± 80 (11)	<0,001	46,8 ± 8 (13)	n.s.
16,7	891,6 ± 74 (14)	<0,001	1 227,8 ± 106 (22)	<0,001	81,6 ± 9 (19)	<0,001

Tabelle 7: Einfluß von GPAIS (guinea pig anti-insulin serum) auf die PPS Aktivität in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml KRB-Albumin Puffer während 90 Minuten unter Zusatz von 16,7 mmol/l Glucose, von Normalserum zu den Kontrollproben und von GPAIS, um 400 bzw. 800 µE IRI zu binden.
Gemessen wurde die Glucoseoxidation entweder von $[1\text{-}^{14}C]$- oder $[6\text{-}^{14}C]$ Glucose sowie die Glucoseutilisation von $[5\text{-}^{3}H]$ Glucose. Der Betrag des "specific yield" von $^{14}CO_2$, der Prozentsatz des PPS und die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS wurden errechnet.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern;
* = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001 vs Kontrolle

	Kontrolle	GPAIS Bindung von	
		400 µE IRI	800 µE IRI
$[1\text{-}^{14}C]$ Glucoseoxidation (pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	199,7 ± 24,2 (38)	260,3 ± 44,2 (12)	256,8 ± 50,6 (18)
$[6\text{-}^{14}C]$ Glucoseoxidation (pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	76,3 ± 5,9 (36)	69,6 ± 22,0 (13)	21,2 ± 15,2*** (16)
Glucoseutilisation (Bildung von THO aus $[5\text{-}^{3}H]$ Glucose in pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	987 ± 214 (12)	892 ± 196 (12)	777 ± 185 (12)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus $[1\text{-}^{14}C]$ Glucose	0,202 ± 0,151 (38)	0,292 ± 0,172 (12)	0,331 ± 0,064* (18)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus $[6\text{-}^{14}C]$ Glucose	0,077 ± 0,036 (36)	0,078 ± 0,089 (13)	0,030 ± 0,019** (16)
Pentose Phosphat Shunt (%)	5,98 ± 1,43 (18)	9,50 ± 3,30 (5)	16,33 ± 4,16** (6)
Absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS (pmol/ 90 min/ 5 Inseln)	59,0 ± 14,1 (18)	84,8 ± 29,4 (5)	126,9 ± 32,3* (6)

Tabelle 8: Insulinkonzentration im Medium nach Inkubation von 5 Inseln in 1 ml KRB-Albumin Puffer während 90 Minuten in Gegenwart von 16,7 mmol/l Glucose. GPAIS (guinea pig anti-insulin serum) wurde zugesetzt, um 400 bzw. 800 µE IRI zu binden, den Kontrollwerten wurde Normalserum zugesetzt.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

GPAIS - Bindung von µE IRI/ml	Gesamtinsulin (µE IRI/ml)	P Werte vs Kontrolle	Freies Insulin (µE IRI/ml)	P Werte vs Kontrolle
0 = Kontrolle	840,1 ± 71 (14)	--	--	--
400	1 189,4 ± 130 (14)	<0,05	163,3 ± 28 (13)	<0,001
800	1 270,6 ± 153 (14)	<0,05	90,5 ± 11 (13)	<0,001

Tabelle 9: Einfluß verschiedener Konzentrationen von Glucose und p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml KRB-Albumin Puffer während 30 Minuten. Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

p-CMB (mM)	Glucose (mM)		
	5,6	11,1	16,7
0 Kontrolle	a) 73 ± 16 (11)	b) 151 ± 19 (5)	c) 252 ± 20 (9)
0,1	d) 82 ± 16 (10)	e) 153 ± 22 (7)	f) 259 ± 30 (9)
0,3	g) 102 ± 14 (10)	h) 174 ± 22 (11)	i) 280 ± 46 (12)
0,5	k) 321 ± 88 (11)	l) 334 ± 55 (17)	m) 468 ± 120 (13)
1,0	n) 632 ± 112 (8)	o) 678 ± 113 (15)	p) 792 ± 134 (12)

Statistische Auswertung:

ad n.s.	be n.s.	cf n.s.	de : $P < 0,05$	kl n.s.	
ag n.s.	bh n.s.	ci n.s.	df : $P < 0,001$	km n.s.	
ak : $P < 0,05$	bl n.s.	cm n.s.			
an : $P < 0,001$	bo : $P < 0,05$	cp : $P < 0,01$	gh : $P < 0,05$	no n.s.	
ab : $P < 0,01$			gi : $P < 0,001$	np n.s.	
ac : $P < 0,001$					

Tabelle 10: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte. 5 Inseln wurden in 1 ml KRB-Albumin Puffer 30 Minuten lang inkubiert. Mittelwerte $\pm$ SEM

Bezeichnung	Zusätze	Anzahl der Versuche (n)	Insulinsekretion (µE IRI/ml)
A	Glucose (5,6 mM)	14	102 $\pm$ 25
B	Glucose (5,6 mM) + p-CMB (0,5 mM)	17	420 $\pm$ 58
C	Glucose (5,6 mM) + p-CMB (0,5 mM) + Exogenes Insulin (100 µE/ml)	11	229 $\pm$ 43
D	Glucose (5,6 mM) + p-CMB (0,5 mM) + Exogenes Insulin (200 µE/ml)	21	176 $\pm$ 30
E	Glucose (5,6 mM) + p-CMB (0,5 mM) + Exogenes Insulin (400 µE/ml)	19	137 $\pm$ 34
F	Glucose (5,6 mM) + p-CMB (0,5 mM) + Exogenes Insulin (800 µE/ml)	20	217 $\pm$ 54

Statistische Auswertung:

AB : $P < 0,001$ BD : $P < 0,001$ BF : $P < 0,05$
BC : $P < 0,05$ BE : $P < 0,001$

Tabelle 11: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Glucose + Aminophyllin induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte.
5 Inseln wurden in 1 ml KRB-Albumin Puffer 90 Minuten lang inkubiert.
Mittelwerte ± SEM

Bezeichnung	Zusätze	Anzahl der Versuche (n)	Insulinsekretion (µE IRI/ml)
A	Glucose (11,1 mM)	17	423 ± 22
B	Glucose (11,1 mM) + Aminophyllin (10 mM)	19	686 ± 35
C	Glucose (11,1 mM) + Aminophyllin (10 mM) + Exogenes Insulin (100 µE/ml)	13	619 ± 37
D	Glucose (11,1 mM) + Aminophyllin (10 mM) + Exogenes Insulin (200 µE/ml)	17	586 ± 33
E	Glucose (11,1 mM) + Aminophyllin (10 mM) + Exogenes Insulin (400 µE/ml)	18	546 ± 29
F	Glucose (11,1 mM) + Aminophyllin (10 mM) + Exogenes Insulin (800 µE/ml)	14	495 ± 42

Statistische Auswertung:

AB : $P < 0,001$ BD : $P < 0,05$ BF : $P < 0,01$
BC n.s. BE : $P < 0,01$

Tabelle 12: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Glucose + Tolbutamid induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte.
5 Inseln wurden in 1 ml KRB-Albumin Puffer 90 Minuten lang inkubiert.
Mittelwerte ± SEM

Bezeichnung	Zusätze	Anzahl der Versuche (n)	Insulinsekretion (µE IRI/ml)
A	Glucose (11,1 mM)	22	467 ± 29
B	Glucose (11,1 mM) + Tolbutamid (0,1 mg/ml)	22	705 ± 29
C	Glucose (11,1 mM) + Tolbutamid (0,1 mg/ml) + Exogenes Insulin (100 µE/ml)	23	595 ± 25
D	Glucose (11,1 mM) + Tolbutamid (0,1 mg/ml) + Exogenes Insulin (200 µE/ml)	22	596 ± 22
E	Glucose (11,1 mM) + Tolbutamid (0,1 mg/ml) + Exogenes Insulin (400 µE/ml)	21	557 ± 48
F	Glucose (11,1 mM) + Tolbutamid (0,1 mg/ml) + Exogenes Insulin (800 µE/ml)	19	486 ± 37

Statistische Auswertung:

AB : $P < 0,001$
BC : $P < 0,01$
BD : $P < 0,01$
BE : $P < 0,05$
BF : $P < 0,001$

Tabelle 13: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Glucose + Arginin•HCl induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte.
5 Inseln wurden in 1 ml KRB-Albumin Puffer 90 Minuten lang inkubiert.
Mittelwerte ± SEM

Bezeichnung	Zusätze	Anzahl der Versuche (n)	Insulinsekretion (µE IRI/ml)
A	Glucose (11,1 mM)	20	457 ± 25
B	Glucose (11,1 mM) + Arginin•HCl (10 mM)	15	852 ± 26
C	Glucose (11,1 mM) + Arginin•HCl (10 mM) + Exogenes Insulin (100 µE/ml)	11	817 ± 119
D	Glucose (11,1 mM) + Arginin•HCl (10 mM) + Exogenes Insulin (200 µE/ml)	9	771 ± 57
E	Glucose (11,1 mM) + Arginin•HCl (10 mM) + Exogenes Insulin (400 µE/ml)	6	660 ± 42
F	Glucose (11,1 mM) + Arginin•HCl (10 mM) + Exogenes Insulin (800 µE/ml)	11	465 ± 44

Statistische Auswertung:

AB : $P < 0{,}001$ BD n.s. BF : $P < 0{,}001$
BC n.s. BE : $P < 0{,}001$

Tabelle 14: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Leucin induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte. 5 Inseln wurden in 1 ml KRB-Albumin Puffer 90 Minuten lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM

Bezeichnung	Zusätze	Anzahl der Versuche (n)	Insulinsekretion (µE IRI/ml)
A	Glucose (5,6 mM)	15	89 ± 13
B	Glucose (5,6 mM) + Leucin (10 mM)	17	374 ± 32
C	Glucose (5,6 mM) + Leucin (10 mM) + Exogenes Insulin (100 µE/ml)	13	335 ± 27
D	Glucose (5,6 mM) + Leucin (10 mM) + Exogenes Insulin (200 µE/ml)	13	277 ± 21
E	Glucose (5,6 mM) + Leucin (10 mM) + Exogenes Insulin (400 µE/ml)	12	206 ± 25
F	Glucose (5,6 mM) + Leucin (10 mM) + Exogenes Insulin (800 µE/ml)	11	214 ± 29

Statistische Auswertung:

AB : $P < 0{,}001$ BD : $P < 0{,}05$ BF : $P < 0{,}001$
BC n.s. BE : $P < 0{,}001$

Tabelle 15: Einfluß von exogenem Insulin auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte. 5 Inseln wurden in 1 ml KRB-Albumin Puffer 90 Minuten lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM

Bezeichnung	Zusätze	Anzahl der Versuche (n)	Insulinsekretion (µE IRI/ml)
A	Glucose (11,1 mM)	25	490 ± 28
B	Glucose (11,1 mM) + Exogenes Insulin (100 µE/ml)	23	485 ± 29
C	Glucose (11,1 mM) + Exogenes Insulin (200 µE/ml)	25	485 ± 31
D	Glucose (11,1 mM) + Exogenes Insulin (400 µE/ml)	18	471 ± 20
E	Glucose (11,1 mM) + Exogenes Insulin (800 µE/ml)	27	441 ± 24

Statistische Auswertung:

Alle Werte nicht signifikant voneinander unterschieden.

Lebenslauf

Am 22. September 1951 wurde ich, Monika Händel, als Tochter des Kaufmanns Willi Händel und seiner Ehefrau Lore, geb. Haaf, in Stuttgart geboren.

Im Alter von 6 Jahren wurde ich in der Römerschule in Stuttgart eingeschult. Im Mai 1962 wechselte ich in das Ev. Mörike-Gymnasium in Stuttgart über. Dort legte ich im Juni 1970 die Reifeprüfung ab.
Im September 1970 trat ich als Praktikantin in die Marien-Apotheke, Dr. H. Spegg, in Stuttgart ein. Das Praktikum unterbrach ich im April 1972 und begann mit dem Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.
Im März 1973 legte ich nachträglich in Stuttgart die pharmazeutische Vorprüfung ab.
Den ersten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung bestand ich im April 1974, den zweiten Abschnitt im September 1975.

Seit November 1975 bis jetzt war ich mit der vorliegenden Dissertation bei Herrn Prof.Dr.med. H.P.T. Ammon beschäftigt. In dieser Zeit war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl Pharmakologie des Pharmazeutischen Institutes tätig.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof.Dr.H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren H. Auterhoff, E. Graf, H. Hamacher, K.-A. Kovar, F. Moll, E. Reinhard (Pharmazie); R.E. Bader (Bakteriologie u. Hygiene); E. Müller, W. Rüdorff (Chemie); H. Seiler (Physik); M. Siess (Pharmakologie).